

**SÉRVIO TÚLIO STINGHEN**

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO PARA DETERMINAR A  
ATIVIDADE DAS FOSFATASES ALCALINAS  
PLACENTÁRIA (PLAP) E PLAP-SÍMILE EM AMOSTRAS DE  
SORO E TECIDO DE PACIENTES ONCOLÓGICOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo

**CURITIBA**

**2005**

# TERMO DE APROVAÇÃO

SÉRVIO TÚLIO STINGHEN

Título: "Desenvolvimento de imunoensaio para determinar a atividade das fosfatases alcalinas placentária (PLAP) e PLAP-símile em amostras de soro e tecido de pacientes oncológicos"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, área de concentração Análises clínicas.

  
Prof. Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo  
Orientador

  
Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka  
Hospital Angelina Caron

  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Iara de Messias-Reason  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 31 de maio de 2005.

Aos meus queridos pais Ayrton e Delormê  
pelo amor, carinho e dedicação.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. Bonald C. Figueiredo pela oportunidade, pelo incentivo à pesquisa, pela orientação desta dissertação e pela amizade.

A minha querida namorada Pati, por estar sempre ao meu lado, pelo carinho, incentivo, dedicação, apoio e pela valiosa orientação.

Aos meus pais. Ao meu irmão Canísio pela grande ajuda nos momentos mais difíceis. Aos meus irmãos Denise, Giovani e Silvana pelo carinho e apoio. Ao meu cunhado Nelson e minhas sobrinhas Luciana, Ana Paula, Lúdia e Viviane.

A Dra. Juliana Moura por todas as orientações e paciência.

Ao professor e amigo Dr. Nei Ferreira de Camargo pelas orientações.

Ao médico veterinário Dr. João Minoso e funcionários do CPPI, pelas imunizações.

À professora e amiga Dra. Maria Suely Leonart pela amizade e por permitir usar equipamentos do laboratório de Citologia Clínica-UFPR. À funcionária Irene pela colaboração e amizade.

Ao professor e amigo Dr. Aguinaldo José do Nascimento pela colaboração.

Ao professor Dr. Luís Caleffe pelas orientações estatísticas.

Aos funcionários do CEGEMPAC pela amizade e pelo ambiente de trabalho. À Giovanna pela colaboração. Ao Renato pelas fotografias e pela amizade. À Elis pela separação de amostras. À Sohaila, Fernanda, Glaci, Cíntia, Geroniza e Miriam pela colaboração.

Ao Peterson Zancanella pela colaboração.

À Dra. Mara Pianovski pelos dados dos pacientes e pelas orientações.

À professora Dra. Almeriane M. W. Santos pelas orientações. Ao professor Dr. Cid Aimbiré M. Santos.

Aos amigos da Divisão de Produção do Hemepar Anália, Josiani, Marta, Marilê, Kátia Grilo, Jaqueline, Sinei, Latoch e Rita, pela compreensão e incentivo.

Aos amigos do mestrado, em especial ao Júlio.

À Chefe da Divisão de Laboratório do Hemepar Dra. Maria do Pilar, por permitir o uso dos equipamentos do Laboratório e à empresa Lablife, em especial Alberto, Jair, Gislene, Rodrigo e Sérgio pela ajuda e permitir uso dos equipamentos.



Aos amigos e proprietários do Laboratório Prolab Dr. Paulo Hatschbach e Dr. Júlio César Merlin pelas determinações bioquímicas das fosfatases alcalinas. Às funcionárias Daniele e Vilma.

Ao Hemobanco, em especial Dra. Karla, Dra. Shizue e Patrícia pela ajuda.

Aos funcionários do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas, em especial ao Dr. Giorgio Baldanzi, Dra. Anna Carolina, Dra. Alessandra, Dra. Liana, Dra. Vera, Dra. Elizabete, Dra. Patrícia e Dra. Noemi pela seleção, coleta e separação de sangue dos doadores.

Ao Dr. Luiz Juliano Neto e sua equipe pela síntese do peptídeo.

Aos professores Dra. Schirley Utiyama e Dr. Paulo Wunder.

À Fabiane e Janaína.

A todos que ajudaram indiretamente esta pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b>	vii
<b>LISTA DE EQUAÇÕES</b>	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	viii
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b>	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	ix
<b>LISTA DE MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS</b>	xi
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b>	xii
<b>RESUMO</b>	xiii
<b>ABSTRACT</b>	xiv
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	3
2.1 MARCADORES TUMORAIS	3
2.2 FOSFATASES ALCALINAS	6
2.2.1 Isoformas, funções, expressão normal e ectópica	6
2.2.2 Genes e polimorfismo	8
2.2.3 Estrutura e propriedades das fosfatases alcalinas	9
2.3 PLAP E PLAP-SÍMILE	13
2.3.1 Associação com neoplasias	13
2.3.1.1 PLAP/PLAP-símile e tumor de ovário	13
2.3.1.2 PLAP/PLAP-símile e tumor de testículo	16
2.3.1.3 PLAP/PLAP-símile e tumores de pulmão e gastrointestinal	19
2.3.1.4 PLAP/PLAP-símile e tumor adrenocortical	20
2.3.2 Anticorpos anti-PLAP e anti-PLAP-símile	21
2.3.3 Ensaio para determinação da PLAP/PLAP-símile	22
<b>3 OBJETIVOS</b>	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	25
4.1 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PLAP HUMANA	25
4.1.1 Seleção do animal para imunização com PLAP humana	25
4.1.2 Preparação do antígeno	25
4.1.3 Imunização do animal	25
4.1.4 Confirmação da imunização	26
4.1.5 Determinação do título de anticorpos de ovelha anti-hPLAP	27
4.1.6 Sangria do animal	29
4.1.7 Separação do soro pós-imunização	30
4.2 EXTRAÇÃO DOS ANTICORPOS DO SORO PÓS-IMUNIZAÇÃO	30

4.3	PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS .....	31
4.3.1	Preparação das colunas de afinidade .....	32
4.3.2	Percentual de ligação .....	34
4.3.3	Purificação de anticorpos anti-hPLAP .....	34
4.3.4	Purificação de anticorpos anti-peptídeo sintético (AA 57-71 da hPLAP) .....	36
4.3.5	Quantificação das imunoglobulinas .....	37
4.4	AMOSTRAS .....	37
4.4.1	Grupo controle .....	38
4.4.2	Pacientes oncológicos .....	38
4.5	DESENVOLVIMENTO DOS IMUNOENSAIOS ICA-PLAP E ICA-PEP .....	38
4.5.1	Determinação da concentração dos anticorpos para sensibilização das microplacas e faixa da linearidade dos ensaios .....	39
4.5.2	Sensibilidade .....	41
4.5.3	Especificidade dos ensaios e quantificação da mistura de amostras de soro de gestantes .....	43
4.5.4	Precisão .....	44
4.5.5	Exatidão .....	44
4.6	DETERMINAÇÃO DA PLAP/PLAP-SÍMILE NOS GRUPOS CONTROLE E PACIENTES ONCOLÓGICOS PELOS MÉTODOS ICA-PLAP E ICA-PEP .....	46
4.6.1	PLAP/PLAP-símile em doadores de sangue e cálculo do valor de corte para indivíduos não fumantes, fumantes ocasionais e fumantes .....	46
4.6.2	PLAP em gestantes .....	47
4.6.3	PLAP/PLAP-símile em pacientes oncológicos .....	47
4.7	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS ALPS TOTAIS PELO MÉTODO BIOQUÍMICO .....	47
4.8	ANALISE ESTATÍSTICA .....	48
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	49
5.1	OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PLAP HUMANA .....	49
5.1.1	Confirmação da imunização .....	49
5.1.2	ELISA indireto .....	49
5.2	PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS .....	50
5.2.1	Síntese do peptídeo .....	50
5.2.2	Percentual de ligação da hPLAP e do peptídeo sintético à Sepharose® .....	51
5.2.3	Quantificação das imunoglobulinas .....	51
5.3	DESENVOLVIMENTO DOS IMUNOENSAIOS .....	51
5.3.1	Determinação da concentração dos anticorpos para sensibilização das microplacas e da faixa de linearidade .....	51

5.3.2 Sensibilidade.....	54
5.3.3 Especificidade dos ensaios e quantificação da mistura de amostras de soro de gestantes .....	54
5.3.4 Precisão .....	56
5.3.5 Exatidão .....	56
5.4 DETERMINAÇÃO DA PLAP/PLAP-SÍMILE NOS GRUPOS CONTROLE PACIENTES ONCOLÓGICOS PELOS MÉTODOS ICA-PLAP E ICA-PEP.....	57
5.4.1 PLAP/PLAP-símile em doadores de sangue e cálculo do valor de corte para indivíduos não fumantes, fumantes ocasionais e fumantes .....	58
5.4.2 Diferenças entre os resultados de atividade catalítica de PLAP em gestantes obtidas pelo método bioquímico comercial (LABTEST) e os ICAs .....	62
5.4.3 PLAP/PLAP-símile em pacientes oncológicos.....	63
5.4.3.1 Amostras de soro de criança com carcinoma embrionário de ovário o .....	63
5.4.3.2 Amostras de tecido de pacientes com tumor adrenocortical.....	64
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	66
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	71
<b>8 PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	72
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73
<b>APÊNDICES</b> .....	87
<b>ANEXOS</b> .....	95

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MARCADORES TUMORAIS COM OS RESPECTIVOS USOS POTENCIAIS .....	5
TABELA 2 - ISOFORMAS DAS FOSFATASES ALCALINAS HUMANAS .....	8
TABELA 3 – GENES E POLIMORFISMO DAS FOSFATASES ALCALINAS HUMANAS.....	10
TABELA 4 – HOMOLOGIA DAS FOSFATASES ALCALINAS HUMANAS COM RELAÇÃO À PLAP .....	10
TABELA 5 – FREQUÊNCIA DA ELEVAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA PLAP/PLAP-SÍMILE E CA 125 NO TUMOR DE OVÁRIO.....	15
TABELA 6 – FREQUÊNCIA DA ELEVAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA PLAP/PLAP-SÍMILE, LDH, AFP E BETA-HCG EM PACIENTES COM TUMOR DE TESTÍCULO .....	18
TABELA 7 – FREQUÊNCIA DE PLAP/PLAP-SÍMILE EM TECIDOS DE PACIENTES COM TUMOR DE TESTÍCULO .....	19
TABELA 8 – PREPARO DE AMOSTRAS PARA OBTENÇÃO DOS DADOS DE RECUPERAÇÃO DOS ENSAIOS ICA-PLAP E ICA-PEP.....	45
TABELA 9 – COEFICIENTES DE VARIAÇÃO INTRA E INTER-ENSAIO DO MÉTODO ICA-PLAP .....	56
TABELA 10 – COEFICIENTES DE VARIAÇÃO INTRA E INTER-ENSAIO DO MÉTODO ICA-PEP.....	56
TABELA 11 – RECUPERAÇÃO DA HPLAP ADICIONADA À MISTURA DE AMOSTRAS DE SORO DE GESTANTES.....	57
TABELA 12 – DISTRIBUIÇÃO DE TABAGISMO POR SEXO EM DOADORES DE SANGUE .....	58
TABELA 13 – RESULTADOS DE HPLAP/PLAP-SÍMILE EM DOADORES DE SANGUE .....	59
TABELA 14 – RESULTADOS DE ALPS E PLAP EM GESTANTES.....	62
TABELA 15 – RESULTADOS DE PLAP/PLAP-SÍMILE EM PACIENTE DE 10 ANOS COM CARCINOMA EMBRIONÁRIO DE OVÁRIO OBTIDOS PELOS MÉTODOS ICA-PLAP E ICA-PEP.....	64

## LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 – CÁLCULO DO VOLUME DO PADRÃO A SER ADICIONADO .....	45
EQUAÇÃO 2 – CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO RECUPERADA .....	45
EQUAÇÃO 3 – CÁLCULO DA PORCENTAGEM RECUPERADA.....	46

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO DÍMERO DE PLAP .....	11
FIGURA 2 – MODELOS DO DÍMERO DE PLAP EM RELAÇÃO À BICAMADA LIPÍDICA .....	12
FIGURA 3 – MODELO PARA ORIGEM DOS TUMORES TESTICULARES DE CÉLULAS GERMINATIVAS EM ADULTOS .....	17
FIGURA 4 – SEQUÊNCIA DO PEPTÍDEO SINTÉTICO AA 57-71 DA HPLAP .....	32
FIGURA 5 – COLUNA DE AFINIDADE <i>SEPHAROSE</i> ®-HPLAP .....	35
FIGURA 6 – COLUNA DE AFINIDADE <i>SEPHAROSE</i> ®-PEPTÍDEO SINTÉTICO .....	36
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS IMUNOENSAIOS ICA-PLAP E ICA-PEP .....	39
FIGURA 8 – RESULTADO DE IMUNODIFUSÃO COM SORO DE OVELHA PRÉ E PÓS-IMUNIZAÇÃO .....	49
FIGURA 9 – TITULAÇÃO DE ANTICORPOS DE OVELHA ANTI-HPLAP POR ELISA INDIRETO .....	50
FIGURA 10 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO IDEAL DE ANTICORPOS ANTI-HPLAP PARA OS ENSAIOS ICA-PLAP E ICA-PEP .....	52
FIGURA 11 – ESPECIFICIDADE DO ENSAIO ICA-PLAP .....	55
FIGURA 12 – ESPECIFICIDADE DO ENSAIO ICA-PEP .....	55
FIGURA 13 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA PLAP/PLAP-SÍMILE NOS GRUPOS CONTROLE E PACIENTES ONCOLÓGICOS PELO MÉTODO ICA-PLAP .....	57

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – REPRESENTAÇÃO DA CURVA PADRÃO DO ENSAIO ICA-PLAP .....	53
GRÁFICO 2 – REPRESENTAÇÃO DA CURVA PADRÃO DO ENSAIO ICA-PEP .....	53
GRÁFICO 3 – PLAP/PLAP-SÍMILE EM DOADORES DE SANGUE PELO MÉTODO ICA-PLAP .....	60
GRÁFICO 4 – PLAP/PLAP-SÍMILE EM DOADORES DE SANGUE PELO MÉTODO ICA-PEP .....	60
GRÁFICO 5 – CORRELAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS ICA-PLAP E ICA-PEP EM DOADORES DE SANGUE ESTRATIFICADO EM FUNÇÃO DO TABAGISMO .....	
GRÁFICO 6 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PLAP/PLAP-SÍMILE EM PACIENTE DE 10 ANOS COM CARCINOMA EMBRIONÁRIO DE OVÁRIO OBTIDAS PELOS MÉTODOS ICA-PLAP E ICA-PEP .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	- Aminoácido(s)
Abs	- Absorbância
Ac	- Anticorpo
AcPLAP	- Ac de ovelha purificado com hPLAP
AcPEP	- Ac de ovelha purificado com peptídeo sintético AA 57-71 da hPLAP
Ag	- Antígeno
ALP(s)	- Fosfatase(s) alcalina(s)
AFP	- Alfa-fetoproteína
CA 19-9	- Antígeno carboidrato 19-9
CA 125	- Antígeno carboidrato 125
CEA	- Antígeno carcinoembrionário
CEGEMPAC	- Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças
CIS	- Carcinoma <i>in situ</i> ou IGCNU
CPPI	- Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos
CV	- Coeficiente de variação
DP	- Desvio padrão
ELISA	- <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
GPI	- Glicosilfosfatidil-inositol
$\beta$ -hCG	- Fração beta da gonadotrofina coriônica humana
HC	- Hospital de Clínicas
HEMEPAR	- Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná
HRPO	- peroxidase extraída de <i>Armoracia rusticana</i> ( <i>horseradish</i> )
I	- Soro inativado pelo calor (65°C, 10 min)
IAP	- Fosfatase alcalina intestinal
ICA	- Imunoensaio para determinação da atividade catalítica
ICA-PLAP	- ICA desenvolvido com anticorpos purificados com hPLAP
ICA-PEP	- ICA desenvolvido com anticorpos purificados com peptídeo sintético
IEC	- Carcinoma embrionário intra-tubular
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
IRMA	- Ensaio imunorradiométrico
IgG	- Imunoglobulina G
IGCNU	- Neoplasia intratubular de células germinativas não classificada ou CIS

IS	- Seminoma Intrabular
LDH	- Lactato desidrogenase
LPCC	- Liga Paranaense de Combate ao Câncer
MT(s)	- Marcador(es) tumoral(is)
NI	- Soro não inativado pelo calor
OPD	- Orto-fenilenodiamina
PBS	- Tampão salina-fosfato
PEP	- Peptídeo sintético
PLAP	- Fosfatase alcalina placentária
hPLAP	- Fosfatase alcalina placentária humana
PLAP-símile	- ALP de células germinativas, GCAP, isoenzima Nagao
PSA	- Antígeno prostático específico
RT-PCR	- Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
RIE	- Radioimunoensaio
SF-1	- Fator esteroideogênico 1
SNI	- Soro não inativado pelo calor (65°C, 10 min)
TI	- Tampão de incubação
TCA	- Tumor adrenocortical ou de córtex adrenal
TMB	- Tetrametilbenzidina
TNAP	- Fosfatase alcalina de fígado/osso/rim ou tecido não específico
TSAP	- Fosfatase alcalina tecido específico
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UNIFESP	- Universidade Federal de São Paulo



## LISTA DE MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Adjuvante de Freund completo	- Sigma-Aldrich F-5881
Adjuvante de Freund incompleto	- Sigma-Aldrich F-5506
Analisador automático de bioquímicas	- HITACHI 911
Anticorpo de jumento anti-IgG de ovelha conjugado com <i>Horseradish Peroxidase</i>	-Sigma-Aldrich A-3415
Balança analítica de precisão	- Shimadzu AY220
Banho Maria	- Nova Técnica
Centrífuga refrigerada	- Hettich UNIVERSAL 32R
Centrífuga sorológica	- Fanem 206 BL
Espectrofotômetro UV	- Shimadzu
Fosfatase alcalina placentária humana	- Sigma-Aldrich P-3895
Fosfatase alcalina intestinal humana	- Calzyme 155A0001
Horseradish peroxidase	- Sigma-Aldrich P-6782
Lavadora automática de microplacas	- TECAN Columbus
Leitora automática de microplacas	- TECAN Spectra Classic
Membrana de celulose para diálise	- Sigma-Aldrich D-9777
OPD	- Sigma-Aldrich
Microplaca de poliestireno	- NUNC-MaxiSorp 96 cavidades
Reagente para determinação das ALPs Alcalina Liquiform)	- LABTEST Diagnóstica(Fosfatase
Sepharose® ativada com CNBr	- Sigma-Aldrich C 9142
TMB	- Sigma-Aldrich

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	- Por cento
CNBr	- Brometo de cianogênio
DMSO	- Dimetilsulfoxida
HCl	- Ácido clorídrico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	- Ácido sulfúrico
NaCl	- Cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	- Bicarbonato de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
r	- Coeficiente de correlação
Tween 20	- Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitano

## RESUMO

A identificação de marcadores tumorais continua sendo um desafio no diagnóstico de neoplasias, e dependendo da sensibilidade e especificidade existirão importantes implicações para a terapêutica e prognóstico. Fosfatase alcalina placentária (hPLAP) e PLAP-símile são marcadores tumorais expressos em neoplasia de ovário, testículo, pulmão, trato gastrointestinal e tumor adrenocortical (TCA). Em condições fisiológicas, PLAP é produzida a partir da 12<sup>a</sup> semana de gestação e PLAP-símile é produzida em baixíssimos níveis, em testículo, cérvix, timo, que se elevam em fumantes. As isoformas das fosfatases alcalinas (ALPs) humanas são (1) ALP placentária (hPLAP) e (2) PLAP-símile, termoestáveis e com 98% de homologia entre si; (3) ALP intestinal (IAP) e (4) tecido não específico (TNAP), termolábeis e com 88% e 56% de homologia com relação à PLAP, respectivamente. O objetivo deste estudo foi desenvolver dois imunoenaios para detecção da atividade catalítica (ICA) da hPLAP/PLAP-símile com anticorpos anti-hPLAP produzidos em ovelha. Foi elaborado um imunoenensaio provavelmente capaz de reconhecer todas as isoformas de PLAP e PLAP-símile (ICA-PLAP), produzido com anticorpos policlonais purificados em coluna de *Sepharose*® ligada a hPLAP, e outro com anticorpos policlonais que reconhecem um epítipo de PLAP (ICA-PEP), purificados com coluna de *Sepharose*® ligada ao peptídeo sintético AA 57-71 da sequência de hPLAP. As metodologias foram padronizadas e validadas com hPLAP e IAP comerciais, amostras de soro de 93 doadores de sangue (não fumantes e fumantes), soro de gestantes e de uma paciente com carcinoma embrionário de ovário, e tecidos de placenta e TCA. Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram 6,5% e 9,9% para o ensaio ICA-PLAP e 3,7% e 9% para o ensaio ICA-PEP. A recuperação variou de 96,1% a 98,4%, e de 97,1% a 103,9% para os ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP, respectivamente. Em ambos os ensaios, a sensibilidade foi igual a 0,1 U/l e o valor de corte igual a 0,2 U/l para não fumante e fumante ocasional, enquanto os resultados preliminares sugerem que níveis de PLAP/PLAP-símile acima de 0,4 U/l em fumantes podem eventualmente revelar uma neoplasia. Os ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP apresentaram uma boa correlação ( $r=0,94$ ). Reação cruzada foi observada numa concentração de IAP de 50 µg/ml (equivalente a 27,5 U/l) no ensaio ICA-PLAP, e de 100 µg/ml no ICA-PEP (equivalente a 55 U/l) e que correspondeu a um resultado de 0,4 U/l, o que seria obtido com apenas 36 ng/ml de PLAP, ou seja, uma concentração cerca de 2800 vezes menor). As atividades de PLAP/PLAP-símile nas amostras de soro da paciente com carcinoma embrionário de ovário diminuíram com a redução do tamanho da massa tumoral no primeiro ciclo de antineoplásicos. Em 77% (17/22) das amostras de tecido de TCA, as atividades de PLAP/PLAP-símile estavam acima do valor de referência obtido para o soro de indivíduos saudáveis (0,2 U/l), porém estes experimentos precisam ser reavaliados em relação ao quadro clínico e comparando-se com a atividade em córtex adrenal normal. Os ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP e os resultados obtidos com os pacientes, sem incluir a atividade de IAP, permitiram concluir que há alguns tipos de tumores que podem ser precocemente detectados usando soro ou amostras de tecido.

Palavras-chave: fosfatase alcalina placentária, marcadores tumorais, imunoenensaio catalítico.

## ABSTRACT

The search for a tumor marker continues to be a challenging issue for cancer diagnosis, and its sensitivity and specificity often have important therapeutic and prognostic implications. PLAP and PLAP-like are tumor markers expressed in malignancies from ovary, testis, lungs, adrenocortical tumors (TCA) and gastrointestinal tract tumors. At physiological conditions, hPLAP is produced by placenta after the twelfth week of pregnancy and PLAP-like by normal thymus, fetal and neonatal testis, and normal endocervix at very low levels, and their levels increase dramatically in smoking individuals. The human alkaline phosphatase (ALP) consisted of a family of four isozymes. Human placental ALP (hPLAP) and PLAP-like, which are stable at 65°C and present 98% homology; intestinal ALP (IAP) and non-specific tissue ALP (TNAP) or liver/bone/kidney ALP, which are not active at 65°C and present 88% and 56% homology with PLAP, respectively. The main goal of this study was to develop two enzymatic immunoassays for PLAP/PLAP-like determination using antibodies produced in sheep: one immunoassay capable of recognizing all possible PLAP and PLAP-like proteins using a polyclonal antibody (ICA-PLAP) purified in affinity-column (*Sephrose*® bound to hPLAP) and the second immunoassay (ICA-PEP) designed to recognize a small part of PLAP (AA 57-71). A standard protocol for both assays was established and afterwards they were tested with commercial hPLAP and IAP, using serum samples from 93 adult individuals (including smoking and non-smoking ones), sera from pregnant women and a patient with ovary embryonal carcinoma, as well as, tissue samples from placenta and childhood TCA. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 6,5% and 9,9% for ICA-PLAP, and 3,7% and 9% for ICA-PEP, respectively. The recovery ranged from 96,1% to 98,4%, and from 97,1% to 103,9% for ICA-PLAP and ICA-PEP, respectively. The working range was from 0.1 U/l to 11 U/l for both assays. PLAP/PLAP-like in serum of non-smoking and apparently normal adult individuals was found up to 0,2 U/l, while smoking individuals seem to present an upper cut-off level of 0,4 U/l. Beyond these values it is recommended to search for neoplastic tissue. Data obtained using the ICA-PLAP assay correlated well to ICA-PEP ( $r=0.94$ ). Cross-reactivity with IAP was observed at high IAP concentrations, 50 µg/ml (or 27,5 U/l) using ICA-PLAP, and higher concentration (100 µg/ml, or 55 U/l) for ICA-PEP (exhibiting only 0,4 U/l, in contrast with 36 ng/ml that would be required for PLAP to reach the same result, which is almost 2800 times less concentrated). Identification of PLAP/PLAP-like activity in a girl with ovary embryonal carcinoma that diminished with tumor size after first cycle of chemotherapy indicated that these assays are efficient and important for follow-up. Using these assays, it was found that 77% (17/22) of the tested TCA tissue samples expressed either PLAP or PLAP-like, however, further research is necessary to better quantify and characterize according to clinical conditions of children. The ICA-PLAP and ICA-PEP assays and the results obtained from patients, without including IAP activity, allowed to conclude that there are subsets of tumors that may be precociously detected using either serum or tissue samples.

Key words: placental alkaline phosphatase, tumor markers, catalytic immunoassay.

## 1 INTRODUÇÃO

Os tumores em geral surpreendem os oncologistas, porque nem sempre apresentam evidências da sua existência nas fases iniciais, quando podem ser curados mediante ressecção cirúrgica. Diante de uma suspeita clínica, o maior desafio é ter acesso a um exame sensível, específico e com a melhor relação custo benefício possível, e que identifique cada tipo de tumor. Entre os métodos complementares, os estudos de imagens são os mais usados para confirmar o diagnóstico e planejar o tratamento. Entretanto, quando existe a possibilidade de se determinar um marcador sérico, o paciente pode ser beneficiado em termos de diagnóstico precoce, maior chance de cura e economia. O oncologista não deve esperar pelas alterações clínicas em populações com elevado risco de câncer, se ele puder solicitar exames laboratoriais de triagem mais frequentemente. Assim, todo paciente que foi tratado de tumor primário que produz um marcador (proteína, metabólitos de neurotransmissores, hormônios) poderá ser periodicamente avaliado quanto à recidiva.

O marcador tumoral ideal deve ser produzido em quantidades mensuráveis nos fluidos corpóreos e detectado apenas na presença de câncer. Um ensaio ideal para detecção de um marcador tumoral deve ser sensível (capaz de detectar pequenas quantidades e não apresentar resultado falso negativo) e específico (sem gerar um resultado falso positivo). Em busca de um ensaio com estas características, foi desenvolvido um método para medir a atividade catalítica das enzimas fosfatase alcalina placentária (hPLAP) e PLAP-símile (fosfatase alcalina de células germinativas), liberadas por tumores embriogênicos, tumores de células germinativas e alguns tumores de células epiteliais. Estas proteínas pertencem à família das fosfatases (ALPs) que inclui também as fosfatases intestinal (IAP) e tecido não específica (ALP óssea, hepática e renal ou TNAP), que circulam no sangue em concentrações que variam de acordo com o período do desenvolvimento, circunstâncias fisiológicas e patológicas, e em resposta a determinados estímulos (MILLÁN; FISHMAN, 1995).

Para identificar a hPLAP e PLAP-símile, minimizando reação cruzada com as outras fosfatases, foram produzidos anticorpos de ovelha anti-hPLAP, selecionados

através de um epítipo de hPLAP ou PLAP-símile que não existe nas demais fosfatases. A homologia entre hPLAP e PLAP-símile é de aproximadamente 98%, enquanto a PLAP se diferencia em 88% e 56% da IAP e TNAP, respectivamente (LE DU *et al.*, 2001). Como recurso adicional, a termoestabilidade de PLAP e PLAP-símile permitiu a inativação das demais fosfatases, separando estas isoforma de IAP e TNAP pelo aquecimento a 65°C por 10 minutos (BOSSI; HOYLAERTS; MILLÁN, 1993). Assim, a molécula de hPLAP comercial purificada (Sigma-Aldrich) e um peptídeo sintético correspondente à sequência de aminoácidos AA 57-71 de hPLAP foram separadamente conjugados à *Sepharose*® para preparar duas colunas de afinidade. Estas colunas foram usadas para capturar dois tipos de anticorpos, um que reconheceu a molécula de hPLAP total (AcPLAP) e outro que reconheceu o epítipo da sequência AA 57-71 da molécula de hPLAP (AcPEP).

Depois de padronizar os ensaios em microplacas de poliestireno com 96 cavidades, sensibilizadas com os dois tipos de anticorpos (purificados com hPLAP e peptídeo sintético), as atividades enzimáticas de hPLAP e PLAP-símile capturadas pelos anticorpos foram determinadas em leitora de microplaca a 405 nm de comprimento de onda. As curvas obtidas para os dois anticorpos foram padronizadas para estimar o valor mínimo e máximo de detecção, os coeficientes de variação intra e inter-ensaio, o percentual de recuperação, avaliação de reação cruzada com IAP comercial (Calzyme), e quantificações de hPLAP e PLAP-símile na placenta e no soro de gestante (controles positivos para hPLAP), em doadores de sangue não fumantes, fumantes ocasionais e fumantes, em paciente portador de carcinoma embrionário de ovário e amostras teciduais de tumor adrenocortical de crianças.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 MARCADORES TUMORAIS

Em certos tipos de câncer, pode ocorrer expressão ou elevação da concentração de proteínas tumorais específicas ou de proteínas usualmente presentes em tecidos fetais ou em desenvolvimento, que podem ser úteis como marcadores tumorais (MTs) (FERGUSSON *et al.*, 1992; LINDBLOM, LILJEGREN, 2000). O MT ideal deve ser produzido exclusivamente por um tipo de tumor e secretado em quantidades mensuráveis nos fluidos corpóreos, deve estar presente apenas na presença do câncer e deve identificar a doença antes do acontecimento de metástases. As concentrações dos MTs nos fluidos corpóreos devem refletir a extensão do tumor, respostas ao tratamento e a progressão da doença (JACOBS; HASKELL, 1991). Os MTs podem ser detectados em tumores sólidos, em células tumorais, circulando no sangue, nos linfonodos, na medula óssea e em outros fluidos corpóreos, como líquido ascítico, urina e fezes. Um MT pode auxiliar na identificação de uma doença específica (diagnóstico, estadiamento da doença ou em *screening* populacional), na detecção de metástases ocultas, na estimativa do volume tumoral, na escolha da terapia; no acompanhamento de respostas ao tratamento, na detecção de recidivas ou, recentemente, como alvo para intervenções terapêuticas em ensaios clínicos (KOSHIDA *et al.*, 1996a; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1998; LINDBLOM, LILJEGREN, 2000).

Os MTs podem ser classificados de acordo com a especificidade. Um MT específico é produzido apenas por células tumorais, por exemplo, quando um oncogene é translocado, funde-se a um promotor ativo de outro gene, e neste processo maligno o gene mutado leva a produção ativa de uma proteína (MT específico), com o conseqüente desenvolvimento de um clone maligno (um exemplo é o cromossomo Filadélfia, específico da leucemia mielóide crônica) (LINDBLOM, LILJEGREN, 2000).

Algumas proteínas são fisiologicamente sintetizadas por células diferenciadas, mas células neoplásicas as produzem em quantidades muito maiores, sendo possível utilizar o aumento da concentração sérica como marcador tumoral.

Um exemplo é o antígeno prostático específico (PSA) no câncer de próstata (LINDBLOM, LILJEGREN, 2000).

Os antígenos fetais são MTs não específicos, expressos durante o desenvolvimento embrionário e por células neoplásicas, sendo exemplos o antígeno carcinoembrionário (CEA), presente em tumores gastrintestinais e outros tipos, e a  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), aplicada ao diagnóstico de câncer hepatocelular, mas também presente em câncer de ovário e testículo (LINDBLOM, LILJEGREN, 2000). A fosfatase alcalina placentária (PLAP), uma isoenzima da fosfatase alcalina normalmente sintetizada pelos sinciotrofoblastos da placenta, está elevada em pacientes com câncer de testículos, ovário, pulmão, estômago e trato gastrointestinal (NATHANSON; FISHMANN, 1971; NOZAWA *et al.*, 1989; MILLÁN; FISHMAN, 1995). Utilizando técnicas de *Western Blotting* e Imunohistoquímica, os estudos desenvolvidos por RODRIGUES *et al.* (submetido) demonstraram a presença de hPLAP em células de tumor de córtex adrenal (TCA).

Até o momento, não existe um marcador tumoral perfeito, mas proteínas com a maioria destas características estão disponíveis para auxiliar os oncologistas (JACOBS; HASKELL, 1991), como as isoformas das fosfatases alcalinas hPLAP e PLAP-símile (MILLÁN; FISHMAN, 1995).

Na tabela 1 estão relacionados exemplos de marcadores tumorais, sua expressão fisiológica, expressão na ausência de malignidade e expressão e uso potencial em neoplasias.



TABELA 1 – MARCADORES TUMORAIS COM OS RESPECTIVOS USOS POTENCIAIS

MARCADOR	EXPRESSÃO FISIOLÓGICA	EXPRESSÃO EM CONDIÇÕES BENIGNAS	EXPRESSÃO EM NEOPLASIAS	USO POTENCIAL EM NEOPLASIAS
Alfa-fetoproteína (AFP)	Desenvolvimento fetal.	Cirrose, hepatite, ataxia-telangiectasia.	Câncer de células germinativas de ovário e testículo, carcinoma hepatocelular.	Detecção e diagnóstico. Acompanhamento dos pacientes após tratamento.
Antígeno carcinoembrionário (CEA)	Pequenas quantidades em indivíduos saudáveis.	Pancreatite, doença hepática, doença inflamatória colo-retal, fumantes.	Câncer colo-retal, melanoma, linfoma, estômago, mama, pulmão, fígado, ovário, rins, tireóide.	Acompanhamento dos pacientes após tratamento.
β-Gonadotrofina Coriônica Humana (β-HCG)	Placenta durante a gestação.	Uso de Maconha.	Coriocarcinoma (útero), doença trofoblástica, ovário, testículo, fígado, estômago, pâncreas e pulmão.	Triagem em mulheres com alto risco de coriocarcinoma. Avaliação do tratamento.
Antígeno Carboidrato 125 (CA 125)	Células do ovário.	Endometriose, doença pélvica inflamatória, peritonite, pancreatite, doença hepática, menstruação e gravidez.	Câncer de ovário, útero, cérvix, pâncreas, fígado, colo, pulmão, mama, trato digestivo.	Avaliação do tratamento, recidiva.
Lactato desidrogenase (LDH)	Todas as células humanas. Concentração elevada ocorre quando há injúria de tecido e morte celular.	Várias condições como insuficiência cardíaca, hipotireoidismo, anemia, doenças do pulmão e fígado.	Em quase todos os tipos de câncer.	Não pode ser utilizado no diagnóstico de um tipo particular de câncer. Útil no monitoramento de Sarcoma de Ewing, linfoma não Hodgkin e leucemia.
Antígeno específico prostático (PSA)	Células prostáticas normais.	Prostatite, hiperplasia prostática benigna.	Câncer de próstata.	Acompanhamento do tratamento, identificação de recidiva.
Antígeno carboidrato 19-9 (CA 19-9)	Pequenas quantidades em tecidos de adultos.	Pancreatite, cirrose hepática, colecistite.	Câncer colo-retal, pancreático, gástrico, do duto biliar.	
Fosfatases alcalinas placentária (PLAP) e de células germinativas (PLAP-símile)	Sinciciotrofoblastos da placenta durante a gravidez, fumantes.	Fumantes, endometriose, adenoma de mama, hepatite B, disfunções da tireóide.	Câncer de ovário, útero, testículo, pulmão, trato gastrointestinal	Monitoramento, identificação de recidiva e metástases, diagnóstico precoce.

FONTES: MILLÁN; FISHMAN, 1995; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1998.

## 2.2 FOSFATASES ALCALINAS

### 2.2.1 Isoformas, funções, expressão normal e ectópica

Fosfatases alcalinas (ALPs) são metaloenzimas diméricas e glicosiladas, ancoradas à membrana celular pelo glicosilfosfatidil-inositol (GPI), que em pH alcalino catalisam a hidrólise de fosfo-monoésteres, liberando fosfato inorgânico e álcool (MICANOVIC *et al.*, 1990; SALSOWSKY *et al.*, 2002).

Em humanos, são conhecidas quatro isoformas, sendo 3 enzimas tecido específico (TSAP) e uma enzima tecido não específico (TNAP). As isoformas tecido específico são: (1) isoenzima Reagan ou fosfatase alcalina placentária (PLAP); (2) PLAP-símile, isoenzima Nagao ou fosfatase alcalina de células germinativas (GCAP); e (3) fosfatase alcalina intestinal (IAP). A fosfatase alcalina tecido não específico está presente no fígado, ossos e rins (MOSS, 1992; PRICE, 1993). Os valores de referência para ALPs em adultos variam de 27 a 100 U/l e em crianças, incluindo adolescentes até 16 anos, de 75 a 390 U/l (MOTTA, 2003; FOSFATASE ALCALINA LIQUIFORM. LABTEST DIAGNÓSTICA, 2001. Bula).

A PLAP humana é produzida pela placenta a partir do final do primeiro trimestre de gestação e nos alvéolos pulmonares de fumantes. A partir da décima segunda semana de gestação, as células das microvilosidades do sinciciotrofoblasto iniciam a produção de PLAP, com aumento gradativo da concentração até 20 semanas, que permanece elevada até o parto, podendo ser observada concentração em torno de 340 U/l (FISHMAN *et al.*, 1976; WILLIAMS; MCLAUGHLIN; JOHNSON, 1986).

Foi demonstrado que a PLAP pode estar relacionada com a transferência de IgG materna para o feto, tem participação na divisão, tanto de células normais como transformadas em decorrência da atividade contra proteínas fosforiladas e pode reduzir a toxicidade de endotoxinas produzidas por bactérias gram-negativas, ao remover grupos fosfato (tabela 2) (BECKMAN *et al.*, 1995; ERIKSSON *et al.*, 2001).

Em mulheres não grávidas e indivíduos não fumantes, a atividade da PLAP corresponde a menos de 1% da fosfatase alcalina total (MUENSCH *et al.*, 1986). Sua expressão ectópica, com elevação da concentração sérica, está associada ao câncer de ovário, testículo, pulmão e trato gastrointestinal (FISHMAN *et al.*, 1976).

PLAP-símile é expressa nos testículos, cérvix e timo. Pequenas quantidades também são sintetizadas pela placenta e pulmões. Assim como a PLAP, a atividade da PLAP-símile corresponde a menos de 1% da fosfatase alcalina total. Esta isoforma está presente em células germinativas primordiais em migração e células germinativas testiculares precoces, possivelmente servindo como molécula guia da célula (tabela 2) (HUSTIN; COLLETTE; FRANCHIMONT, 1987). O dano celular causado pelo cigarro pode provocar a liberação e aumento da concentração sérica de PLAP-símile. Após parar de fumar, a concentração retorna ao normal em 1 a 2 meses (WILLIAMS; MCLAUGHLIN; JOHNSON, 1986; HAIJE; VAN DRIEL; VAN DER BURG, 1987; WEISSBACH; BUSSAR-MAATZ; MANN, 1997). MUENSCH *et al.* (1986), analisando indivíduos saudáveis, encontraram concentração sérica de PLAP-símile entre 0 e 0,14 U/l em não fumantes (n = 98) e entre 0 e 1,02 U/l em fumantes (n = 65). Esta isoforma tem sido utilizada na prática clínica como marcador de carcinoma de testículo *in situ*, seminoma e coriocarcinoma (HOFFMANN *et al.*, 1989; WADA; CHOU, 1993; ILLES; IND; CHARD, 1997; WEISSBACH; BUSSAR-MAATZ; MANN, 1997; NOURI *et al.*, 2000).

IAP é expressa na membrana de células intestinais do feto e do adulto e está relacionada com a absorção intestinal (tabela 2). Durante a dieta, a IAP entra na circulação através do ducto torácico linfático e é rapidamente reabsorvida pelos receptores hepáticos, determinando concentrações baixas no soro. Indivíduos dos grupos sanguíneos A e AB apresentam concentração sérica de IAP menores em relação aos indivíduos dos grupos B e O. Os valores de referência para adultos saudáveis variam de 0 a 19 U/l (PRICE, 1993). Concentrações elevadas desta isoenzima estão correlacionadas com cirrose e carcinoma hepatocelular (KEIDING, 1964; FISHMANN; INGLIS; KRANT, 1965; DOMAR; HIRANO; STIGBRAND, 1991).

TNAP é encontrada em tecidos não específicos como fígado, ossos e rins. A produção placentária desta enzima é observada até a décima segunda semana de gestação, quando é substituída pela PLAP (FISHMAN *et al.*, 1976; WEISS *et al.*, 1988). Nos tecidos ósseos, sua função é hidrolisar pirofosfato inorgânico para garantir a mineralização óssea, atingindo as maiores concentrações séricas em crianças de 0 a 16 anos (tabela 2) (PRICE, 1993). Concentrações séricas elevadas de TNAP podem indicar a presença osteossarcomas, doença de Paget e metástase óssea (WEISS *et al.*, 1988).

TABELA 2 – ISOFORMAS DAS FOSFATASES ALCALINAS HUMANAS

ISOFORMA	SINÔNIMOS	FUNÇÃO	EXPRESSÃO FISIOLÓGICA	EXPRESSÃO ECTÓPICA
PLACENTÁRIA	PLAP Isoenzima Reagan	Transporte de IgG. Divisão celular. Reduzir a toxicidade de bactérias gram-negativas	Placenta * Fumantes	Câncer de ovário, testículo, pulmão, trato gastro-intestinal, tumor adrenocortical.
DE CÉLULAS GERMINATIVAS	PLAP-símile GCAP Isoenzima Nagao	Migração de células germinativas primordiais.	Testículos Cérvix Timo Placenta** Pulmões** Fumantes	Carcinoma de testículo <i>in situ</i> , seminoma, coriocarcinoma, Câncer de ovário, Tumor adreno-cortical.
INTESTINAL	IAP	Absorção intestinal.	Enterócitos	Carcinoma hepatocelular.
TECIDO NÃO ESPECÍFICO	TNAP ALP de Ossos/Fígado/Rins	Mineralização óssea.	Placenta*** Ossos Fígado Rins	Osteocarcinoma, doença de Paget, Metástase óssea.

FONTES: NATHANSON; FISHMAN, 1971; MUENSCH *et al.*, 1986; MOSS, 1992; PRICE, 1993; MILLÁN; FISHMAN, 1995; ERIKSSON *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.* (submetido).

NOTAS: \*após a 12ª semana até o final da gestação; mulheres não gestantes e indivíduos não fumantes possuem menos de 1% de PLAP com relação às ALPs totais; \*\* produz pequenas quantidades; \*\*\* até a 12ª semana de gestação.

GOLDSTEIN *et al.* (1980; 1982) estudaram ALP em várias espécies de mamíferos, incluindo a humana, primata, canina, felina e ovina, e demonstraram que somente humanos e grandes símios (gorilas e chimpanzés) têm uma ALP específica da placenta, a PLAP. Os demais mamíferos expressam TNAP nos tecidos placentários. Todas as espécies estudadas expressam IAP.

## 2.2.2 Genes e polimorfismo

As fosfatases alcalinas tecido específico (TSAP), PLAP, GCAP E IAP, são respectivamente codificadas pelos genes *ALPP*, *ALPPL2* e *ALPI*, estritamente relacionados entre si e localizados no braço longo do cromossomo 2 (tabela 3). Cada gene apresenta 11 exons e 10 introns, e 4,5 quilobases de DNA (KAM *et al.*, 1985; GRIFFIN *et al.*, 1987; MILLÁN; MANES, 1988; HENTHORN *et al.*, 1988).

O gene *ALPP* está localizado na região 2q37 e três alelos comuns foram clonados e sequenciados, *ALPP1* (ou *PI<sup>1</sup>*), *ALPP2* (ou *PI<sup>2</sup>*) e *ALPP3* (ou *PI<sup>3</sup>*), que codificam as proteínas PLAP tipo 1 ou S, tipo 2 ou I, e tipo 3 ou F, respectivamente (KAM *et al.*, 1985; MILLÁN, 1986; KNOLL; ROTHBLUM; LONGLEY, 1987; 1988).

Esta classificação se baseia na mobilidade eletroforética de cada proteína, sendo S (*slow*) para mobilidade lenta, F (*fast*) para mobilidade rápida e I (*intermediate*) para mobilidade intermediária. Seis fenótipos comuns podem ser expressos na população: S (1), FS (2-1), F (2), I (3), SI (3-1) e FI (3-2) (BOYER, 1961; ROBSON; HARRIS, 1967). Os alelos F, I e S são mais comuns em caucasianos, asiáticos e negros africanos, respectivamente (BECKMAN; BECKMAN, 1969).

PLAP humana tem alto grau de polimorfismo genético, tendo sido identificados pelo menos 18 alelos raros. Os alelos comuns são responsáveis por 97,5% dos fenótipos da PLAP, e os alelos raros, por 2,5%. Com a combinação entre alelos comuns e raros, foram descritos 48 fenótipos em placentas de caucasianos, negros e asiáticos (BECKMAN; BECKMAN, 1969; SATO *et al.*, 1988; MILLÁN; FISHMAN, 1995).

O gene *ALPPL2* está localizado na região 2q37 e quatro alelos variantes foram seqüenciados, indicando a presença de pelo menos 10 fenótipos diferentes de PLAP-símile (MILLÁN; ERIKSSON; STIGBRAND, 1982; MARTIN *et al.*, 1987; MILLÁN; MANES, 1988; MILLÁN; FISHMAN, 1995).

O gene *ALPI* está localizado na região 2q37.1, e diferente da PLAP e PLAP-símile, não foi observado polimorfismo na IAP (HENTHORN *et al.*, 1988).

TNAP é codificada pelo gene *ALPL*, localizado no braço curto do cromossomo 1, na região p34-36.1 (SMITH *et al.*, 1988), com 12 exons e 11 introns, e 50 Kb de DNA, não tendo sido observado polimorfismo (tabela 3) (WEISS *et al.*, 1988).

### 2.2.3 Estrutura e propriedades das fosfatases alcalinas

Os produtos dos genes das ALPs são pré-proteínas contendo peptídeos sinalizadores ligados aos grupos amino e carboxila terminais. Estes peptídeos são clivados e a proteína se liga covalentemente ao GPI (Asp-481), resultando na sua forma madura de dímeros. Cada monômero das proteínas PLAP, PLAP-símile e IAP contém 479 resíduos de aminoácidos, enquanto a proteína TNAP possui 484 resíduos de aminoácidos (figura 1) (LE DU *et al.*, 2001; LE DU; MILLÁN, 2002).

TABELA 3– GENES E POLIMORFISMO DAS FOSFATASES ALCALINAS HUMANAS

ISOFORMA	GENE	POLIMORFISMO	FENÓTIPOS
PLAP	<i>ALPP</i> região 2q37	3 alelos comuns: <i>ALPP1</i> , <i>ALPP2</i> e <i>ALPP3</i> Alelos raros	48 fenótipos 6 fenótipos comuns*: S, FS, F, I, SI e FI
PLAP-símile	<i>ALPPL2</i> região 2q37	4 alelos	10 fenótipos
IAP	<i>ALPI</i> região 2q37.1	Não observado	-
TNAP	<i>ALPL</i> região 1p34-36.1	Não observado	-

FONTES: BECKMAN; BECKMAN, 1969; KAM *et al.*, 1985; MILLÁN; MANES, 1988; HENTHORN *et al.*, 1988; SMITH *et al.*, 1988.

NOTAS: \*classificação de acordo com a mobilidade eletroforética - F (*fast*) para mobilidade rápida, S (*slow*) para mobilidade lenta e I (*intermediate*) para mobilidade intermediária; SI, FI e FS – fenótipos mistos com mobilidade entre S e I, F e I, F e S, respectivamente.

Estudos com a hPLAP demonstraram uma variação no seu peso molecular, sendo que cada monômero possui entre 58 e 74 kDa (GREENE; SUSSMAN, 1973; USTEGUI-GOMEZ; YEAGER; TARBUTTON, 1974; ERIKSSON *et al.*, 2001; LETHO; SHAROM, 2002). Esta variação pode ser explicada pela presença de várias glicoformas e/ou oligômeros da PLAP (ERIKSSON *et al.*, 2001). Os sítios de glicosilação da enzima estão localizados na Asn-122 e Asn-249 (LE DU *et al.*, 2001).

PLAP, PLAP-símile e IAP são 88-98% homólogas, enquanto que a isoforma TNAP é cerca de 50% idêntica às demais. A hPLAP difere em 10 (2%) aminoácidos da PLAP-símile, 58 (12%) aminoácidos da IAP e 209 (44%) aminoácidos da TNAP (tabela 4) (WATANABE *et al.*, 1991; LE DU *et al.*, 2001; LE DU; MILLÁN, 2002).

TABELA 4 – HOMOLOGIA ENTRE AS FOSFATASES ALCALINAS HUMANAS E A PLAP

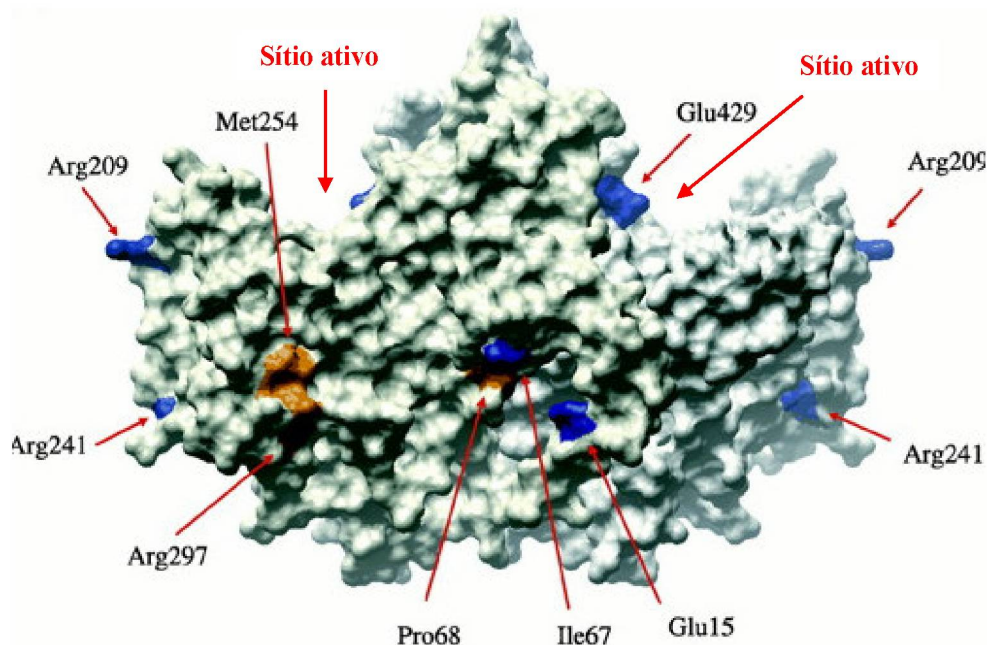
ISOFORMA	HOMOLOGIA EM RELAÇÃO À PLAP (%)	DIFERENÇA COM A PLAP (NÚMERO DE AMINOÁCIDOS)
PLAP-símile	98	10
IAP	88	58
TNAP	56	209

FONTES: LE DU *et al.*, 2001; LE DU; MILLÁN, 2002.

Os fenótipos mais comuns da PLAP, tipos 1 (S) e 2 (F), diferem entre si apenas pela substituição da arginina por prolina na posição 209 (HOYLAERTS; MILLÁN, 1991). O fenótipo tipo 1 difere do 3 (I) em sete aminoácidos: pro-3-leu, met-44-val, arg-241-his, gln-255-arg, thr-263-ala, tyr-367-cys, ser-372-gly, respectivamente (HENTHORN *et al.*, 1986).

Os resíduos que diferem a PLAP da PLAP-símile são o glu-15, ile-67, arg-209, arg-241, e glu-429 (figura 1) (LE DU *et al.*, 2001).

FIGURA 1 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO DÍMERO DA PLAP



FONTE: LE DU *et al.*, 2001.

NOTAS: Colorido - resíduos da PLAP que diferem da PLAP-símile; azul - resíduos únicos da PLAP; alaranjado - resíduos conservados em pelo menos uma das outras isoformas de ALP.

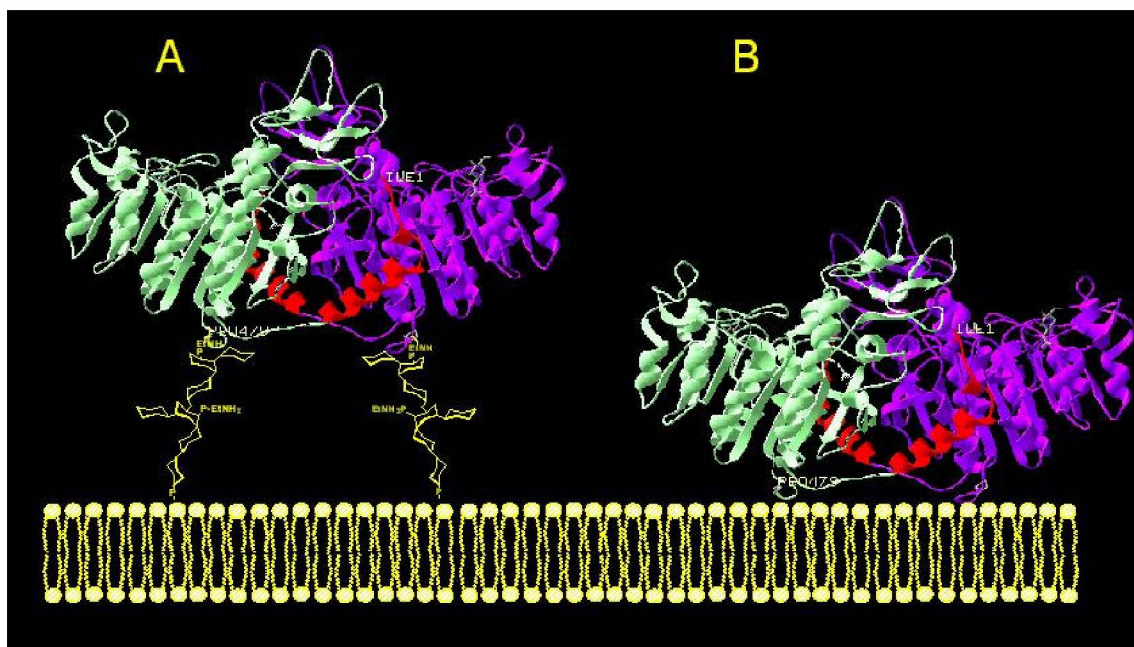
LETHO e SHAROM (2002) demonstraram que a PLAP se localiza muito próxima da interface da bicamada lipídica, em microdomínios lipídicos, na forma de dímeros, sendo modulada pela membrana celular. Dois modelos possíveis foram descritos. Em um modelo (*lollipop*), a proteína estaria mais afastada da superfície celular (figura 2A), e no modelo mais provável (*flop down*), a proteína estaria em contato direto com a membrana celular (figura 2B).

LE DU e MILLÁN (2002) demonstraram que a PLAP se encontra como homodímeros e pode formar heterodímeros com PLAP-símile e IAP, mas não com a TNAP. A PLAP pode ser encontrada na forma de homodímeros PLAP/PLAP ou na forma híbrida PLAP/PLAP-símile e PLAP/IAP. A isoforma Kasahara, encontrada em células neoplásicas e IAP fetal, são heterodímeros de PLAP/IAP (IMANISHI *et al.*, 1990). Células cancerosas de ovário expressam heterodímeros de PLAP/PLAP-símile (WATANABE *et al.*, 1989).



ALPs podem ser clivadas da membrana celular por fosfolipases específicas C e D. Assim, além dos tecidos, as fosfatases alcalinas podem ser detectadas no soro e outros fluidos corporais, como líquido pleural e ascítico (FERGUSSON *et al.*, 1992; PRICE, 1993).

FIGURA 2 – MODELOS DO DÍMERO DE PLAP EM RELAÇÃO À BICAMADA LIPÍDICA



FONTE: LETHO; SHAROM, 2002.

NOTAS: (A) Estrutura cristalográfica do dímero de PLAP, mostrando os dois ancoramentos GPI em conformação estendida (modelo *lollipop*), em que o centro da proteína se encontra afastado da superfície celular. (B) Modelo mais provável do posicionamento de PLAP (*flop down*), em que a enzima está diretamente em contato com a bicamada lipídica.

O sítio ativo das ALPs está localizado numa fenda, na parte superior na molécula, próximo ao domínio em forma de coroa (figura 1). O sítio ativo da PLAP é constituído por um grupo de aminoácidos Tyr-276, Arg-314, Glu-321, Arg-323, Arg-326, Glu-418, Arg-420, e Glu-429 e uma região hidrofóbica situada na base da fenda (Lys-87, Phe-107, Gln-108, Arg-166, Asn-167, Tyr-367). O sítio ativo da PLAP-símile difere da PLAP pela troca do ácido glutâmico por glicina na posição 429 (LE DU; MILLÁN, 2002).

Diferente das ALPs de *Escherichia coli*, ALPs de mamíferos são enzimas alostéricas, ou seja, a ligação do substrato com um dos sítios ativos afeta o segundo sítio ativo. Os resíduos envolvidos nesta propriedade são Asn-84, Tyr-367 e Glu-429 (HOYLAERTS; MANES; MILLÁN, 1997). A atividade enzimática das ALPs pode ser



inibida pelo calor, EDTA, L-homarginina, L-leucina, L-fenilalanina e peptídeos relacionados, L-Leu-Gly-Gly e L-Phe-Gly-Gly. PLAP e PLAP-símile, isoenzimas termoestáveis, não são inibidas pelo calor (65°C, por 10 minutos), ao passo que IAP e TNAP são termolábeis. PLAP, PLAP-símile e IAP são inibidas por L-leucina e L-fenilalanina, enquanto a TNAP é inibida por L-homoarginina (BOSSI; HOYLAERTS; MILLÁN, 1993; KOZLENKOV *et al.*, 2002; LE DU; MILLÁN, 2002).

## 2.3 PLAP E PLAP-SÍMILE

### 2.3.1 Associação com neoplasias

Em mulheres não grávidas e indivíduos não fumantes, a atividade da PLAP/PLAP-símile corresponde a menos de 1% das ALPs (MUENSCH *et al.*, 1986). Sua expressão ectópica está associada ao câncer de ovário, testículo, pulmão, trato gastrointestinal (PAIVA *et al.*, 1983; LE DU; MILLÁN, 2002) e tumor adrenocortical em pacientes pediátricos (RODRIGUES *et al.*, submetido).

#### 2.3.1.1 PLAP/PLAP-símile e tumor de ovário

Em 2005, estima-se que serão diagnosticados aproximadamente 22 mil novos casos de tumor de ovário, resultando em 16 mil mortes nos Estados Unidos (*American Cancer Society*, 2005). Segundo dados da Liga Paranaense de Combate ao Câncer (LPCC, 2004), entre os anos de 2000 a 2002 foram diagnosticados 82 casos de tumor de ovário no Hospital Erasto Gaertner de Curitiba, correspondendo a 2,3% dos casos de câncer no sexo feminino, dado semelhante ao relatado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), com 2,7%, no período de 1994 a 1998. Geralmente, o tumor de ovário é assintomático nos estádios iniciais, resultando num diagnóstico tardio e taxa de mortalidade de 65% (VAN HOUWELINGEN *et al.*, 1989).

Os tumores de ovário podem ter origem em células epiteliais (carcinoma) ou em células germinativas. O carcinoma de ovário é uma das neoplasias ginecológicas mais comuns em mulheres adultas, enquanto que em crianças, a neoplasia costuma ter origem em células germinativas (MOROWITZ *et al.*, 2003).

O uso de marcadores tumorais como CA-125, AFP, LDH,  $\beta$ -HCG e PLAP/PLAP-símile, pode aumentar a sensibilidade e especificidade no diagnóstico precoce do tumor de ovário, aumentando os índices de sobrevida em cinco anos de 20% em estádios tardios para 80-90% em estágio precoce (MUNRO *et al.*, 1991; BEREK; BAST JR., 1995).

Concentração sérica elevada de PLAP/PLAP-símile foram encontradas em 25-65,5% dos pacientes com neoplasia de ovário (MALKIN *et al.*, 1978; MANO *et al.*, 1986; MUENSCH *et al.*, 1986; NOZAWA *et al.*, 1989; FISKEN *et al.*, 1989; VERGOTE *et al.*, 1992; BEREK; BAST JR., 1995; IND *et al.*, 1997). Os resultados variaram de acordo com o do método utilizado, tipo e estadiamento do tumor (tabela 5). Foram encontradas concentrações séricas aumentadas em 43-45% de todos os tipos de carcinomas epiteliais (VERGOTEN *et al.*, 1992; IND *et al.*, 1997), em 57-61% dos cistadenocarcinomas serosos (tipo celular de carcinoma) e em 83-100% disgerminomas (neoplasia de células germinativas) (DE BROE; POLLET, 1988; NOZAWA *et al.*, 1989).

Estudos têm comparado o uso dos marcadores CA-125,  $\beta$ -HCG, PLAP, PLAP-símile, CA-19-9, AFP e CEA para o tumor de ovário. A PLAP/PLAP-símile apresentou sensibilidade de 34-65%, superior ao  $\beta$ -HCG, CA 19-9 e CEA, e menor quando comparada ao CA 125 (71-85%) e AFP (88%) (NEWLANDS; HOLDEN; BAGASHAW, 1988), mas foi melhor indicador de sobrevida (IND *et al.*, 1997) e mais específica (95%) que o CA 125 (71%) (NOZAWA *et al.*, 1989).

Na presença de neoplasias de ovário, a concentração sérica da PLAP/PLAP-símile varia desde pequenas elevações do valor de referência até acima de 5.000 UI/L (MANO *et al.*, 1986; VERGOTE *et al.*, 1987; FISKEN *et al.*, 1989). Após o tratamento com antineoplásicos ou cirurgia, as concentrações de PLAP/PLAP-símile decrescem até concentrações não detectáveis, o que possibilita o acompanhamento do tratamento (HAIJE; VAN DRIEL; VAN DER BURG, 1987; VERGOTE; ONSRUD; NUSTAD, 1987). BEN-ARIE *et al.* (1999) relataram um caso de paciente com aumento da concentração sérica de fosfatase alcalina precedendo o diagnóstico clínico de câncer de ovário em mais de 2 anos. Segundo estes autores, mulheres com elevação da concentração sérica da ALP de origem desconhecida deveriam realizar a determinação da isoenzima PLAP, que seria o primeiro marcador de carcinoma de ovário pré-clínico.

TATEKAWA *et al.* (2004) relataram o caso de uma criança de cinco anos, com disgerminoma, que apresentou imunohistoquímica positiva para PLAP/PLAP-símile (anticorpos policlonais de coelho anti-hPLAP), mas negativa para CA-125 e  $\beta$ -HCG (anticorpos monoclonais para os dois marcadores).

TABELA 5 - FREQUÊNCIA DA ELEVAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE PLAP/PLAP-SÍMILE E CA-125 NO TUMOR DE OVÁRIO

AUTOR	NEOPLASIA	CONCENTRAÇÃO ELEVADA		MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA PLAP/PLAP-SÍMILE
		CA-125	PLAP/PLAP-SÍMILE	
MALKIN <i>et al.</i> , 1978	Carcinoma e células germinativas	NA	14/56 (25%)	Atividade catalítica após inativação pelo calor
MCLAUGHLIN <i>et al.</i> , 1983	Carcinoma	NA	23/65 (35%)	ICA, mAb H317
MANO <i>et al.</i> , 1986	Carcinoma e células germinativas	NA	17/63 (27%)	RIE competitivo, pAb anti-hPLAP coelho
MUENSCH <i>et al.</i> , 1986	Carcinoma e células germinativas	NA	4/9 (44%)	Calor e fluorimetria
DE BROE; POLLET, 1988	Carcinoma e células germinativas	NA	64/130 (49%)	ICA, mAb 327
	Cistadenocarcinoma seroso		11/18 (61%)	
	Disgerminoma		5/6 (83%)	
NOZAWA <i>et al.</i> , 1989	Carcinoma e células germinativas	70/91 (77%)	31/91 (34%)	ICA, mAb 327 e mAb C2, anti-hPLAP
	Cistadenocarcinoma seroso		18/31 (58%)	
	Disgerminoma		4/4 (100%)	
FISKEN <i>et al.</i> , 1989	Carcinoma e células germinativas	190/262 (73%)	169/262 (65%)	ICA, ELISA, mAb H17E2
VERGOTE <i>et al.</i> , 1992	Carcinoma	115/135 (85%)	58/135 (43%)	IRMA, mAb C2 anti-hPLAP
BEREK <i>et al.</i> , 1995	Carcinoma e células germinativas	83%	NA	NA
IND <i>et al.</i> , 1997	Carcinoma	79/111 (71%)	50/111 (45%)	IRMA

NOTAS: NA - não avaliado; IRMA - ensaio imunorradiométrico; RIE - radioimunoensaio; ICA - imunoensaio para atividade catalítica; ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*; mAb - anticorpo(s) monoclonal(is); pAb - anticorpo policlonal; C2 - mAb que reconhece somente PLAP; H317, H17E2, 327 - mAb que reconhecem PLAP e PLAP-símile.

### 2.3.1.2 PLAP/PLAP-símile e tumor de testículo

Com o diagnóstico precoce, emprego de cirurgia, medicamentos antineoplásicos e radioterapia, a sobrevivência em cinco anos dos pacientes portadores de tumores de testículo aumentou de 50% para 90% nos últimos 45 anos. Entre os anos de 2000 a 2002 foram diagnosticados 62 casos de tumor de testículo no Hospital Erasto Gaertner de Curitiba, correspondendo a 2% dos casos de câncer no sexo masculino (LPCC, 2004), dado superior ao relatado pelo INCA, com 1,3%, no período de 1994 a 1998.

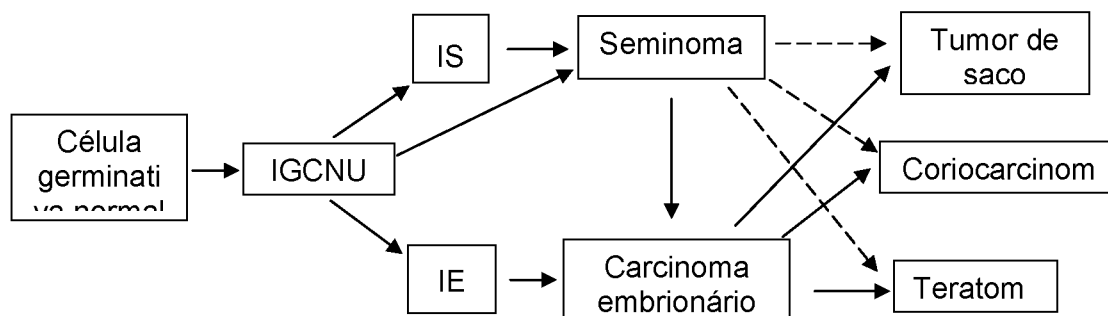
Os tumores de testículo podem ser divididos em neoplasia intratubular de células germinativas (ou carcinoma *in situ*, CIS), germinativos, não germinativos e mistos. Os tumores de células germinativas, que incluem seminomas e não-seminomas (carcinoma embrionário, teratoma, coriocarcinoma e tumor do saco vitelino), e os tumores mistos, correspondem a 90% das neoplasias testiculares. O seminoma é o mais freqüente na população adulta, enquanto tumor do saco vitelino é mais comum em crianças (MOSTOFI; SESTERHENN; DAVIS, 1987; DIAS NETO *et al.*, 2002).

Seminomas, CIS e carcinoma embrionário expressam grandes quantidades de PLAP e PLAP-símile. Um estudo utilizando Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa (RT-PCR), demonstrou que seminoma e CIS expressam predominantemente PLAP-símile, ao passo que no carcinoma embrionário, as quantidades de PLAP e PLAP-símile variam (ROELOFS *et al.*, 1999). Considerando que os tumores testiculares germinativos têm origem comum no CIS (figura 3) (BERNEY *et al.*, 2004), a detecção da PLAP/PLAP-símile possibilita um diagnóstico precoce, aumentando as chances de cura.

Concentrações séricas elevadas de PLAP/PLAP-símile foram encontradas em 22-89% dos pacientes com neoplasia de testículo (JEPPSON *et al.*, 1983; TUCKER *et al.*, 1985; FORD *et al.*, 1985; DE BROE; POLLET, 1988; KOSHIDA *et al.*, 1990; KOSHIDA *et al.*, 1996a; 1996b; WEISSBACH *et al.*, 1997; REDKAR; DAMLE, 1997). Os resultados variaram de acordo com o método utilizado, tipo e estadiamento do tumor (tabela 6). Foi encontrado aumento da concentração sérica de PLAP/PLAP-símile em 33-47% dos seminomas no estágio I, 56-89% em seminomas estágios II e

III (FORD *et al.*, 1985; KOSHIDA *et al.*, 1996a), e 22-33% em não-seminomas (TUCKER *et al.*, 1985; KOSHIDA *et al.*, 1996a,b).

FIGURA 3 - MODELO PARA ORIGEM DOS TUMORES TESTICULARES DE CÉLULAS GERMINATIVAS EM ADULTOS



FONTE: BERNEY *et al.*, 2004.

NOTAS: Linhas descontínuas - modelo proposto em raras transformações; IGCNU ou CIS - neoplasia intratubular de células germinativas não classificada ou carcinoma *in situ*; IEC - carcinoma embrionário intratubular; IS - seminoma intratubular.

FORD *et al.* (1985) compararam o uso da PLAP/PLAP-símile, AFP e  $\beta$ -HCG, em pacientes com seminoma e encontraram aumento da concentração sérica em 45%, 7% e 31% dos casos, respectivamente (tabela 6). KOSHIDA *et al.* (1996b) compararam o uso da PLAP/PLAP-símile, AFP,  $\beta$ -HCG e LDH, e encontraram concentrações séricas aumentadas em 51%, 0%, 47% e 59% dos casos de pacientes com seminoma, respectivamente. Neste mesmo estudo, em pacientes com tumor não seminoma, foi observado aumento da concentração sérica de PLAP/PLAP-símile em 22% dos casos, de AFP em 78%, 63% de  $\beta$ -HCG em 63% e de LDH em 48%. Em outro estudo com pacientes com seminoma, foi observado aumento da concentração sérica de PLAP/PLAP-símile em 56% dos casos, de  $\beta$ -HCG em 35% e de LDH em 34% (tabela 6) (WEISSBACH *et al.*, 1997).

WEISSBACH *et al.* (1997), demonstraram que a PLAP/PLAP-símile é o melhor marcador para diagnosticar recidiva e o seu aumento após orquidectomia é um mau prognóstico. Pacientes com altas concentrações de PLAP/PLAP-símile antes da cirurgia tiveram normalização da concentração da enzima após a orquidectomia. Durante o tratamento com antineoplásicos, a queda lenta (prolongado tempo de meia-vida) dos marcadores tumorais como a PLAP, LDH e AFP, pode predizer uma baixa resposta à terapia (KOSHIDA; WAHREN, 1990;

KOSHIDA *et al.*, 1998). WEHRSCHUTZ *et al.* (2002), descreveram o caso de um paciente com diagnóstico clínico de câncer de pâncreas, que posteriormente, foi identificado como metástase originada de seminoma pela detecção de concentrações elevadas de PLAP/PLAP-símile.

TABELA 6 – FREQUÊNCIA DA ELEVAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA PLAP/PLAP-SÍMILE, LDH, AFP E  $\beta$ -HCG EM PACIENTES COM TUMOR DE TESTÍCULO

AUTOR	NEOPLASIA	CONCENTRAÇÕES ELEVADAS				MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA PLAP/PLAP-SÍMILE
		AFP	$\beta$ -HCG	LDH	PLAP/PLAP-SÍMILE	
JEPPSSON <i>et al.</i> , 1983	Seminoma	NA	NA	NA	55/100 (55%)	RIE, pAb coelho
TUCKER <i>et al.</i> , 1985	Seminoma	NA	NA	NA	14/16 (88%)	ICA, mAb H17E2
	Seminoma + teratoma				7/13 (54%)	
	Teratoma				7/21 (33%)	
FORD <i>et al.</i> , 1985	Seminoma				1/3 (33%)	ELISA, mAb H17E2
	Estádio I	1/15 (7%)	3/15 (20%)	NA		
	Estádio II-III	2/27 (7%)	11/27 (41%)		10/18 (56%)	
DE BROE; POLLET, 1988	Seminoma	NA	NA	NA	38/53 (72%)	ICA, mAb 327
	Não-seminoma				9/26 (35%)	
KOSHIDA <i>et al.</i> , 1990	Câncer testicular	NA	NA	NA	62/184 (34%) (pAb)	ELISA, pAb coelho e mAb H7
					40/184 (22%) (mAb)	
KOSHIDA <i>et al.</i> , 1996a	Seminoma: Estádio I	NA	NA	NA	15/32 (47%)	ICA, mAb HPMS-1
	Estádio II-III				8/9 (89%)	
	Não-seminoma: Estádio I				2/13 (15%)	
	Estádio II-III				4/11 (36%)	
KOSHIDA <i>et al.</i> , 1996b	Seminoma	0	24/51 (47%)	30/51 (59%)	26/51 (51%)	ICA, mAb
	Não-seminoma	21/27 (78%)	17/27 (63%)	13/27 (48%)	6/27 (22%)	
WEISSBACH <i>et al.</i> , 1997	Seminoma	NA	247/726 (35%)	150/440 (34%)	97/174 (56%)	ICA, mAb 12X8T
REDKAR; DAMLE, 1997	Seminoma	NA	NA	NA	70/97 (72%) 72/97 (74%)	RIE ELISA pAb coelho

NOTAS: NA - não avaliado; IRMA - ensaio imunorradiométrico; RIE - radioimunoensaio; ICA - imunoensaio para atividade catalítica; ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*; mAb - anticorpo monoclonal anti-hPLAP; pAb - anticorpo policlonal anti-hPLAP; H17E2, 327, 12X8T e H7 = mAb que reconhecem PLAP e PLAP-símile.

Estudos em tecidos de pacientes com tumor de testículo, utilizando imunohistoquímica, encontraram resultados positivos para PLAP/PLAP-símile em 76% dos casos de carcinoma embrionário e em 90-100% dos casos de seminomas (tabela 7) (UCHIDA *et al.*, 1981; MANIVEL *et al.*, 1987; CHEVILLE *et al.*, 2000; HENLEY *et al.*, 2004).

TABELA 7 – FREQUÊNCIA DE PLAP/PLAP-SÍMILE EM TECIDOS DE PACIENTES COM TUMOR DE TESTÍCULO

AUTOR	NEOPLASIA	PLAP/PLAP-SÍMILE	MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA PLAP/PLAP –SÍMILE
UCHIDA <i>et al.</i> , 1981	Seminoma	8/9 (90%)	Imunohistoquímica
MANIVEL <i>et al.</i> , 1987	Seminoma	55/56 (98%)	Imunohistoquímica, pAb coelho
CHEVILLE <i>et al.</i> , 2000	Seminoma	64/64 (100%)	Imunohistoquímica, mAb 8A9
	Carcinoma embrionário	13/17 (76%)	
HENLEY <i>et al.</i> , 2004	Seminoma intratubular	12/12 (100%)	Imunohistoquímica

NOTAS: mAb - anticorpo monoclonal anti-hPLAP; pAb - anticorpo policlonal anti-hPLAP; 8A9 - mAb que reconhece PLAP e PLAP-símile.

### 2.3.1.3 PLAP/PLAP-símile e tumores de pulmão e gastrointestinal

Concentrações séricas elevadas de PLAP/PLAP-símile foram relatadas em pacientes com tumor de pulmão por NATHANSON e FISHMANN (1971). Utilizando técnica de inativação pelo calor, os autores encontraram aumento das concentrações séricas de PLAP/PLAP-símile em 40% dos pacientes, mesmo índice observado por MUENSCH *et al.* (1986). Um estudo multicêntrico, empregando a técnica de imunoensaio para determinação da atividade catalítica (ICA) de PLAP/PLAP-símile, utilizando anticorpo monoclonal, encontrou concentrações séricas elevadas em 20% dos pacientes com tumor de pulmão (DE BROE; POLLET, 1988).

Concentrações séricas elevadas de PLAP/PLAP-símile foram relatadas em 36-54% dos pacientes com tumor gastrointestinal, sendo 36% para neoplasia gástrica e 50-54% para câncer colo-retal (DE BROE; POLLET, 1988, MUENSCH *et al.*, 1986; HARMENBERG *et al.*, 1989). WATANABE *et al.* (1990), analisando tecidos de pacientes com câncer gástrico e colo-retal, por imunohistoquímica com anticorpo

monoclonal A10-10, encontraram positividade para PLAP/PLAP-símile em 23% dos casos, sendo 42% e 12% dos casos de carcinoma gástrico altamente e pouco diferenciado, respectivamente. O mesmo autor relatou 11% de positividade para carcinoma colo-retal.

#### 2.3.1.4 PLAP/PLAP-símile e tumor adrenocortical

O tumor de córtex adrenal ou adrenocortical (TCA) é um câncer raro em crianças e extremamente agressivo (RODRIGUEZ-GALINDO *et al.*, 2005), com taxa de sobrevida de 5 anos para 54,2% dos pacientes com idade inferior a 20 anos (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004). O TCA acontece no sul do Brasil, mais especificamente no Paraná, com uma incidência 30 vezes superior a da França (DESANDES *et al.*, 2004; PIANOVSKI *et al.*, no prelo). O TCA de crianças do sul do Brasil e São Paulo é decorrente de uma mutação na linhagem germinativa no gene *TP53* (R337H), transmitida por um dos progenitores (RIBEIRO *et al.*, 2001; LATRONICO *et al.*, 2001). Entretanto, a penetrância para o TCA é de apenas 10% (FIGUEIREDO *et al.*, no prelo).

Estudos utilizando técnicas de *Western Blotting* e Imunohistoquímica demonstraram a presença de hPLAP/PLAP-símile em células de TCA de crianças (RODRIGUES *et al.*, submetido). As indicações para os estudos de RODRIGUES *et al.* (submetido) e do atual estudo partiram da dedução de que o TCA poderia ser embrionário pelas seguintes razões: (1) a maior parte (80-90%) dos tumores do adulto é benigna; (2) o tipo de tumor do adulto tem sua caracterização como benigno ou maligno pelo exame histopatológico, o que não é possível para o TCA pediátrico; (3) os tumores benignos do adulto quase sempre são não funcionais, ou seja, não produzem sinais ou sintomas de excesso hormonal, enquanto que o não funcional da criança geralmente é maligno, consegue crescer sem causar manifestações clínicas e geralmente é diagnosticado no estágio avançado; (4) o tumor pediátrico apresenta amplificação do locus 9q34 (FIGUEIREDO *et al.*, 1999) que não é encontrado no adulto, e está relacionada com ganho ou amplificação do gene que codifica o fator esteroideogênico 1 (*SF-1*) em 60-80% dos casos (FIGUEIREDO *et al.*, 2005); (5) a maior parte dos tumores da criança é diagnosticada entre 1 e 3 anos de idade, sendo que o aparecimento do tumor é ainda mais precoce, com base em



relatos dos pais de que as manifestações clínicas surgem de 3 meses a 1 ano antes, aproximando do nascimento da criança e do período de desenvolvimento do córtex da glândula adrenal (FIGUEIREDO *et al.*, 2000).

Muitas vezes, o tumor tem um crescimento lento e, em 10% dos casos pediátricos, pode não apresentar sintomas, embora esta forma seja mais comum na idade adulta (RIBEIRO; FIGUEIREDO, 2004), atrasando o diagnóstico e comprometendo o sucesso do tratamento. Frente a isto, a determinação sérica da PLAP poderia ser utilizada como um provável indicador da presença do TCA (primário ou recidivante), sendo a única possibilidade de detecção precoce (em relação à tomografia), na ausência de evidências clínicas.

### 2.3.2 Anticorpos anti-PLAP e anti-PLAP-símile

Anticorpos policlonais e monoclonais anti-hPLAP/PLAP-símile podem ser produzidos pela imunização de animais com hPLAP purificada, extraída de placenta humana. Anticorpos policlonais obtidos através da imunização de coelhos, têm afinidade com diferentes epítomos da PLAP/PLAP-símile, e podem ocasionalmente reagir com a IAP. SHINODA *et al.* (1988), observaram reação cruzada com anticorpos policlonais a partir de uma concentração de 22,50 U/l de IAP, valor acima do encontrado em adultos saudáveis (0 a 19 U/l) (PRICE, 1993). A reação cruzada com a IAP pode ser evitada através da purificação (1) por cromatografia de afinidade com coluna de *Sepharose*® ligada a IAP (que retém anticorpos inespecíficos) ou *Sepharose*® ligada a um peptídeo sintético correspondente a um epítopo específico da hPLAP, conferindo comportamento de anticorpo monoclonal (MOURA *et al.*, 2004), ou (2) pela inativação das isoformas IAP (e TNAP) pelo calor, antes de se determinar a atividade catalítica da PLAP/PLAP-símile (MALKIN *et al.*, 1978; MILLÁN; STIGBRAND, 1981).

Anticorpos monoclonais produzidos pela imunização de camundongos com hPLAP (dos quais são retirados os linfócitos B para serem fusionados com células de hibridomas e selecionados) reagem com um único epítopo desta proteína, e apresentam boa especificidade, embora na maioria das vezes não distingam PLAP de PLAP/símile devido ao alto grau de homologia entre elas (MILLÁN; STIGBRAND, 1983; LE DU; MILLÁN, 2002). Os anticorpos monoclonais C2 reconhecem apenas a

PLAP, enquanto os anticorpos monoclonais H17E2, 327, 8A9, 12X8T e H7 reconhecem PLAP e PLAP/símile (DE BROE; POLLET, 1988; NOZAWA *et al.*, 1989; FISKEN *et al.*, 1989; KOSHIDA *et al.*, 1990; WEISSBACH *et al.*, 1997; CHEVILLE *et al.*, 2000). Os anticorpos monoclonais podem ser empregados para mapear os determinantes antigênicos da PLAP e PLAP-símile (MILLÁN; STIGBRAND, 1983), para imunolocalização de tumores ou para terapia (DURBIN *et al.*, 1988). Devido o alto grau de polimorfismo do gene *ALPP*, os anticorpos monoclonais anti-hPLAP podem não detectar todas as isoformas da enzima, apresentando resultados falso negativos, ou podem não detectar epítomos perdidos na clivagem de PLAP da membrana (KOSHIDA *et al.*, 1990).

### 2.3.3 Ensaios para determinação da PLAP/PLAP-símile

PLAP e PLAP-símile são enzimas termoestáveis, cuja atividade catalítica pode ser mensurada em soro ou tecido pelo método bioquímico, após inativação das isoformas IAP e TNAP pelo aquecimento das amostras a 65°C por 10 minutos (MALKIN *et al.*, 1978).

Os imunoensaios com anticorpos policlonais e monoclonais são mais sensíveis e específicos que a quantificação de ALPs após inativação pelo calor. PLAP/PLAP-símile podem ser detectadas e quantificadas pelo método de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (ENGVALL; PERLMAN, 1971; ENGVALL, 1980), radioimunoensaio (RIE) competitivo (MANO *et al.*, 1986), ensaio imunorradiométrico (IRMA) (VERGOTE *et al.*, 1992) e imunoensaios que medem a atividade catalítica (ICA) (NOZAWA *et al.*, 1989).

Nos imunoensaios ELISA e IRMA, a concentração antigênica da PLAP/PLAP-símile é realizada pelo princípio sanduíche. Um anticorpo primário anti-hPLAP fixado em fase sólida (microplacas ou tubos de poliestireno), reage com a enzima. Após lavagem para retirar o excesso de amostra não ligada, um segundo anticorpo marcado (conjugado) com enzima (ELISA) ou com substância radioativa (IRMA) é adicionado, formando um imunocomplexo anticorpo primário-hPLAP/PLAP-símile-conjugado. A leitura é realizada após a lavagem para retirar o excesso de conjugado e a amostra é analisada em contador gama (IRMA) ou, para o ELISA, um substrato para a enzima do conjugado é adicionado juntamente com um cromógeno, formando

um produto final colorido que é mensurado em leitora de microplacas com filtro específico. No RIE competitivo, a amostra é adicionada simultaneamente com o conjugado (hPLAP marcada com substância radioativa) e ambas competem pelo anticorpo primário ligado à fase sólida. Após lavagem para retirar excesso de amostra e conjugado não ligado, é realizada leitura em contador gama.

Nos imunoensaios ICA, anticorpos anti-hPLAP fixados em fase sólida (microplaca de poliestireno) reagem com a PLAP/PLAP-símile presente na amostra, e após a lavagem para retirada do excesso de amostra não ligada, o substrato p-nitrofenilfosfato (em pH alcalino) é adicionado e a cor do produto final da atividade catalítica (p-nitrofenol) é mensurada em leitora de microplacas. Esse método tem sensibilidade de 0,1 U/l (McLAUGHLIN; GEE; JOHNSON, 1983; NOZAWA *et al.*, 1989), boa reprodutibilidade, com coeficientes de variação intra e inter-ensaio inferiores a 10% (McLAUGHLIN; GEE; JOHNSON, 1983; HAIJE; VAN DRIEL; VAN DER BURG, 1987; DE BROE; POLLET, 1988; FISKEN *et al.*, 1989) e faixa de linearidade de 0 a 20 U/l (McLAUGHLIN; GEE; JOHNSON, 1983).

Imunoensaios para determinação da atividade catalítica da PLAP/PLAP-símile não estão disponíveis comercialmente no Brasil. Na Europa, um *kit* para 96 determinações de PLAP/PLAP-símile (INNOTEST®hPLAP, <http://www.innogenetics.com/site/diagnostics.html>) custa mais de R\$ 2.100,00. O desenvolvimento de um ensaio ICA sensível, reprodutível, específico e com uma relação custo-benefício adequada, possibilitaria a pesquisa desse marcador tumoral em todos os casos de neoplasias descritos anteriormente, possibilitando aos oncologistas um diagnóstico precoce, esclarecer a origem do tumor em casos de exames histopatológicos duvidosos, detecção de recidivas e metástases, seguimento terapêutico e possivelmente estabelecer o prognóstico.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver dois imunoensaios para determinação da atividade catalítica de PLAP e PLAP-símile no soro e tecidos humanos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Produzir anticorpos anti-hPLAP/PLAP-símile e purificar por cromatografia de afinidade.
2. Padronizar os imunoensaios em microplacas sensibilizadas por anticorpos através da determinação da sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, precisão e exatidão.
3. Estabelecer o valor de corte de hPLAP/PLAP-símile no soro de indivíduos saudáveis não fumantes, fumantes ocasionais (menos de 15 cigarros por dia) e fumantes (mais de 15 cigarros por dia).
4. Validar o ensaio com amostras de soro e tecido de pacientes com neoplasias que expressam PLAP ou PLAP-símile.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PLAP HUMANA**

#### **4.1.1 Seleção do animal para imunização com PLAP humana**

Para a imunização com hPLAP foi utilizada uma ovelha de 4 meses de idade, 40 Kg, número de série 0762, nunca antes utilizada para tal fim, que ficou sob os cuidados dos médicos veterinários do Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos (CPPI) e permitiu a obtenção de grandes volumes de soro.

#### **4.1.2 Preparação do Antígeno**

Foram preparadas 7 doses com o antígeno liofilizado comercial (hPLAP, Sigma-Aldrich). Para a primeira, foram dissolvidos 2 mg de hPLAP em 1 ml de tampão salina-fosfato (PBS) 0,05 M, pH 7,4 e misturadas a 1 ml de adjuvante de Freund completo à hPLAP dissolvida em PBS. Esta emulsão foi homogeneizada e acondicionada de 2 a 6°C até a aplicação do antígeno no animal.

As demais doses do antígeno foram preparadas como a primeira, substituindo-se o adjuvante de Freund completo pelo adjuvante de Freund incompleto. Todas as doses foram preparadas no dia da aplicação e homogeneizadas antes da injeção.

#### **4.1.3 Imunização do animal**

As coletas de amostras, aplicação do antígeno e sangria foram realizadas pelos médicos veterinários do CPPI.

Antes da primeira dose do antígeno, foram coletados 11 ml de sangue da ovelha (soro pré-imunização).

O antígeno foi aplicado por via subcutânea, em quatro pontos do animal, sendo duas aplicações na região axilar (esquerda e direita) e duas na região inguinal

(esquerda e direita). As 7 doses foram aplicadas com intervalo de quinze dias. As sexta e sétima doses foram aplicadas após a confirmação da imunização pela técnica de imunodifusão dupla (item a seguir).

#### 4.1.4 Confirmação da imunização

Uma semana após a administração da quinta dose do antígeno, foram coletados 10 ml de sangue da ovelha e o soro foi avaliado quanto a presença de títulos de anticorpos anti-hPLAP suficientes para serem detectados pelo ensaio de imunodifusão dupla de Ouchterlony (1953), descrito abaixo:

1. Foi preparado o gel para imunodifusão com 1,6 g de polietilenoglicol, 0,4 g de agarose e 0,1 g de azida sódica, completando-se o volume para 100 ml com PBS 0,01 M pH 7,2. A solução foi aquecida em banho-maria fervente até ficar transparente.
2. Uma lâmina de vidro plana e sem riscos foi limpa com álcool absoluto e seca em papel absorvente.
3. Foi adicionado 3,5 ml do gel sobre a lâmina de vidro, com auxílio de uma pipeta de vidro de 5 ml até que toda a superfície fosse preenchida.
4. Após a solidificação do gel, foram feitos 5 poços na lâmina com auxílio de uma ponteira de ponta larga.
5. O soro pós-imunização foi diluído em PBS 0,05 M pH 7,4 em diluição de 1:2 e 1:4. O antígeno (hPLAP) foi diluído em PBS 0,05 M, pH 7,4; na concentração de 1 mg/ml.
6. No poço central da lâmina foram pipetados 25 µl do antígeno diluído e nos demais poços foram pipetados 25 µl do soro pós-imunização puro (1:1), 1:2 e 1:4; e 20 µl do soro pré-imunização, nos respectivos poços.

7. A lâmina de imunodifusão foi incubada à temperatura ambiente em câmara úmida, por 24 horas.

8. Foi realizada a leitura visual da imunodifusão.

#### 4.1.5 Determinação do título de anticorpos de ovelha anti-hPLAP

Uma semana após a sétima (última) injeção do antígeno, foram coletados 10 ml de sangue da ovelha e o soro foi utilizado para determinar as concentrações séricas de anticorpos anti-PLAP pelo método de ELISA indireto (ENGVALL, 1980). O método consiste na sensibilização de uma fase sólida (microplaca de poliestireno) com o antígeno (hPLAP), em seguida foram adicionados em cada etapa: (1) soro de ovelha contendo anticorpos anti-hPLAP; (2) conjugado constituído de anticorpo de jumento anti-IgG de ovelha marcado com peroxidase extraída de *Armoracia rusticana* (*horseradish*) (HRPO, Sigma-Aldrich); (3) mistura de substrato para HRPO ( $H_2O_2$ ) e cromógeno orto-fenilenodiamina (OPD) ou tetrametilbenzidina (TMB); (4)  $H_2SO_4$  1N para bloquear a reação. A leitura da absorbância do produto final colorido foi realizada em leitora automática de microplacas.

O procedimento foi adaptado de ENGVALL e PERLMAN (1971) e ENGVALL (1980), como descrito a seguir:

1. Setenta e duas cavidades de uma microplaca de poliestireno foram sensibilizadas com 100  $\mu$ l (para cada poço) do antígeno hPLAP dissolvido em tampão de carbonato pH 9,6 (*Coating buffer*) na concentração de 10  $\mu$ g/ml (1 $\mu$ g/poço), por um período entre 12 e 16 horas, a 4°C.
2. Após incubação a 4°C, a microplaca foi lavada por 2 ciclos com solução de lavagem (salina com *Tween 20* a 0,05%), em lavadora de microplacas automática, para a retirada do antígeno (hPLAP) que não aderiu à fase sólida.

3. A cada poço sensibilizado da microplaca, foram pipetados 100 µl de uma solução de bloqueio contendo caseína a 2% em PBS 0,05 M, pH 7,4; com o objetivo de preencher os sítios das cavidades onde não houve aderência do antígeno.
4. A microplaca foi incubada por uma hora, em estufa a 37°C.
5. Após a incubação, a microplaca foi lavada por 2 ciclos com solução de lavagem, em lavadora automática, e o líquido restante nas cavidades foi retirado por inversão da placa em papel absorvente.
6. Para o branco da reação, a cada poço das linhas "A" até "H" da primeira, quinta e sexta colunas da microplaca, foram pipetados 100 µl tampão de incubação (TI), constituído por 0,25% de caseína e 0,05% de *Tween 20* em PBS pH 7,4. Foram pipetados 100 µl do soro pré-imunização em diluição seriada de 1:10 a 1:1.280 em TI, nas cavidades das fileiras "A" até "H" da segunda e sétimas colunas da microplaca, respectivamente. Foram pipetados 100 µl do soro pós-imunização em diluição seriada de 1:2.000 a 1:256.000 em TI, nas cavidades das linhas "A" até "H" das colunas 3, 4, 8 e 9 da microplaca, respectivamente.
7. A microplaca foi incubada por uma hora, em estufa, a 37°C.
8. Após a incubação, a microplaca foi lavada por 5 ciclos com solução de lavagem, em lavadora automática, e o líquido restante nas cavidades foi retirado por inversão da placa em papel absorvente.
9. Foram pipetados 100 µl de anticorpos de jumento anti-imunoglobulina G (IgG) de ovelha conjugados à HRPO (Sigma-Aldrich), diluídos 1:2.000 (colunas 1 a 3; 5 a 8; 10 a 12) e 1:4.000 (colunas 4 e 9) em TI.
10. A microplaca foi incubada por uma hora, em estufa, a 37°C.



11. Após a incubação, a microplaca foi lavada por 5 ciclos com solução de lavagem, em lavadora automática, e o líquido restante nas cavidades foi retirado por inversão da placa em papel absorvente.
12. A cada poço das colunas 1 a 4 da microplaca, foram pipetados 100 µl de uma solução de cromógeno/substrato contendo OPD em concentração de 0,33 ng/ml diluída em tampão citrato 0,5 M, pH 5,2; e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,04%.
13. A cada poço das colunas 5 a 12 da microplaca, foram pipetados 100 µl de uma solução de cromógeno/substrato contendo 200 µl de TMB 41 mM, em dimetilsulfoxida (DMSO), e 8 ml de tampão citrato pH 4,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (w/v) (FREY *et al.*, 2000).
14. A microplaca foi incubada por 30 minutos, a temperatura ambiente (18-25°C), ao abrigo da luz.
15. A reação foi bloqueada pela adição de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N, a cada poço.
16. Foi realizada a leitura da absorbância em leitora automática, com filtro de leitura em 450 nm e filtro de referência em 620 nm para o TMB e filtro de leitura em 492 nm e filtro de referência de 620 nm para o OPD.

#### 4.1.6. Sangria do animal

Determinado o título de anticorpos por ELISA Indireto, a ovelha foi submetida à sangria. Para poupar o animal, foram realizadas duas coletas de 750 ml de sangue com intervalo de 48 horas, das veias jugulares esquerda e direita, respectivamente.

O sangue foi coletado em frascos estéreis de polipropileno de 50 ml sem anticoagulante, e transportado à temperatura ambiente.

#### 4.1.7 Separação do soro pós-imunização

Os frascos de polipropileno foram deixados em banho-maria a 37°C até a retração do coágulo. Os frascos foram centrifugados por dez minutos a 2.500 rotações por minuto (rpm).

O soro foi separado com auxílio de pipetas Pasteur descartáveis de 3 ml, em frascos estéreis de polipropileno de 50 ml, os quais foram armazenados em freezer a -80°C.

Foi obtido um volume total de soro pós-imunização de 800 ml.

#### 4.2 EXTRAÇÃO DOS ANTICORPOS DO SORO PÓS-IMUNIZAÇÃO

O soro da ovelha obtido pós-imunização foi tratado com solução saturada de sulfato de amônio para precipitar as moléculas de imunoglobulinas G (IgG). Este procedimento não desnatura as proteínas e estabiliza a solução.

Foi utilizado um protocolo modificado da AMERSHAM BIOSCIENCES (ANTIBODY PURIFICATION HANDBOOK, 2002), como descrito a seguir:

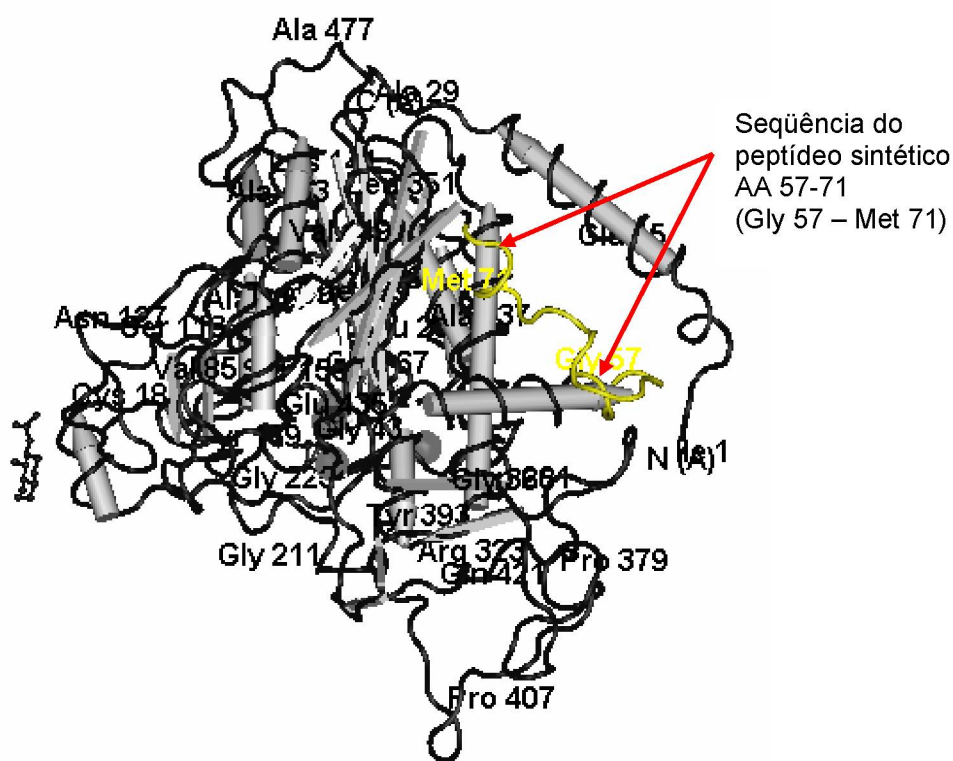
1. Aproximadamente 400 ml do soro da ovelha foram descongelados à temperatura ambiente e centrifugado a 10.000 rpm, por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C.
2. O sobrenadante foi transferido para um béquer e alcalinizado com 40 ml (proporção 1:10) de tampão Tris-HCl 1M, pH 8,0.
3. Foi adicionada solução saturada de sulfato de amônio, lentamente, a 4°C, sob leve agitação. A solução tornou-se esbranquiçada com um total de 300 ml de solução saturada de sulfato de amônio foi adicionado e a solução foi deixada em geladeira a 4°C, sob leve agitação, por 18 horas.
4. A solução foi centrifugada a 10.000 rpm, por 20 minutos, a 4°C.

5. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado duas vezes, ressuspendendo-o em igual volume de sulfato de amônio e depois centrifugando-o a 10.000 rpm, por 20 minutos, a 4°C.
6. O precipitado foi dissolvido em aproximadamente 60 ml de PBS 0,05M, pH 7,4.
7. A solução obtida foi dialisada em membrana de celulose previamente fervida, em PBS 0,05M, pH 7,4, para remoção do sulfato de amônio. Esta membrana retém mais de 90% das moléculas com peso molecular acima de 12.400 Da. A diálise foi realizada a 4°C, sob leve agitação, durante 48 horas, em erlemmeyer de 2 litros. O PBS foi substituído a cada hora durante as 3 primeiras horas e posteriormente a cada 12 horas, totalizando 14 litros.
8. Após a diálise, a solução foi fracionada em 3 frascos contendo 20 ml cada, e congelada a -80°C, para posterior purificação.

#### 4.3 PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS

Os anticorpos específicos anti-hPLAP foram purificados por cromatografia de afinidade, utilizando-se duas colunas de *Sepharose*® (CUATRECASAS, 1970 a,b; YOUNG *et al*, 1975), sendo uma coluna ligada covalentemente à PLAP (coluna 1 - PLAP) e a outra coluna ligada covalentemente ao peptídeo sintético contendo a sequência de aminoácidos (AA) 57 a 71 da PLAP (coluna 2 – peptídeo). A sequência de 15 aminoácidos (AA 57-71) escolhida para síntese do peptídeo difere em 2 AA da PLAP-símile, 3 AA da IAP e 9 AA da TNAP (LE DU *et al.*, 2001), e corresponde a uma alça livre da proteína, de fácil acesso para o anticorpo (figura 4). A *Sepharose*® é constituída de polímeros de agarose (anidrogactose e gactose) na forma de um colar de contas (PORATH; AXÉN; ERNBACK, 1967; CUATRECASAS, 1970a).

FIGURA 4 – SEQUÊNCIA DO PEPTÍDEO SINTÉTICO AA 57-71 DA hPLAP



FONTE: NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI).

NOTA: o peptídeo AA 57-71 corresponde a uma alça livre na proteína, de fácil acesso do anticorpo, com a sequência: Gly-Gln-Lys-Lys-Asp-Lys-Leu-Gly-Pro-Glu-Ile-Pro-Leu-Ala-Met.

#### 4.3.1 Preparação das colunas de afinidade

O peptídeo contendo a sequência de aminoácidos 57 a 71 da PLAP foi sintetizado pelo Prof. Dr. Luiz Juliano Neto, no Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), segundo KATES e ALBERÍCIO (2000).

Cada coluna de *Sepharose*® -PLAP (coluna 1) e *Sepharose*® -peptídeo (coluna 2) foi preparada conforme o protocolo da AMERSHAM BIOSCIENCES (2002), descrito a seguir:

1. Um grama de *Sepharose*® ativada com brometo de cianogênio (*Sepharose*®-CNBr 4B), foi expandida com 5 ml de HCl 1mM, por 15 minutos.

2. Em seguida, o gel foi transferido para um tubo de 10 ml e lavado 6 vezes com HCl 1mM (total de 200 ml), utilizando-se centrífuga a 5.000 rpm, a 4°C, por dez minutos, para cada lavagem. Foi obtido um volume de 3,5 ml de gel.
3. Foram dissolvidos 20 mg de PLAP (coluna 1) ou 22,9 mg do peptídeo sintético (AA 57-71) (coluna 2) em 7,5 ml de tampão de ligação, contendo NaHCO<sub>3</sub> 0,1M, pH 8,3 em NaCl 0,5 M. Foi separado 0,5 ml de cada diluição para dosar proteínas e calcular o percentual de ligação ao gel.
4. O gel foi lavado com tampão de ligação, centrifugado a 5.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. Sete mililitros de PLAP ou do peptídeo sintético diluído em tampão de ligação foi adicionado ao gel e incubado sob agitação leve em agitador orbital, por 2 horas, à temperatura ambiente. Nesta etapa são formados ésteres de ácido imino carbônico que reagem com o grupo amino de proteínas e peptídeos (PORATH; AXÉN; ERNBACK, 1967; CUATRECASAS, 1970b).
5. O gel foi centrifugado a 3.500 rpm, por 10 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi separado para dosar proteínas e calcular o percentual de ligação ao gel.
6. Os sítios que permaneceram ativos foram bloqueados com a adição de glicina 0,2 M, pH 8,0; em solução de NaCl 0,5 M. A solução foi agitada por duas horas em agitador orbital, à temperatura ambiente.
7. O gel foi submetido a lavagens alternadas com aumento e redução de pH em 5 ciclos. Redução de pH: 40 ml de tampão acetato 0,1 M em 0,5 M de NaCl, pH 4,0. Aumento de pH: 40 ml de tampão bicarbonato 0,1 M em NaCl 0,5 M, pH 8,3.

8. O gel foi lavado 2 vezes em PBS 0,5 M, pH 7,4; em centrífuga a 3.000 rpm, por 5 minutos, a 4°C.
9. O gel foi colocado em coluna para cromatografia de afinidade com sistema de ultra filtração que impede a sua saída.
10. Foi adicionado PBS 0,5 M, pH 7,4; contendo 0,05% de azida sódica para conservação do gel, e a coluna foi mantida a 4°C.

#### 4.3.2 Percentual de ligação

Para os cálculos do percentual de ligação da PLAP e do peptídeo sintético à *Sepharose®*, comparou-se a absorbância da solução inicial (antes da adição à *Sepharose®*) com a do sobrenadante, obtidas com a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 280 nm.

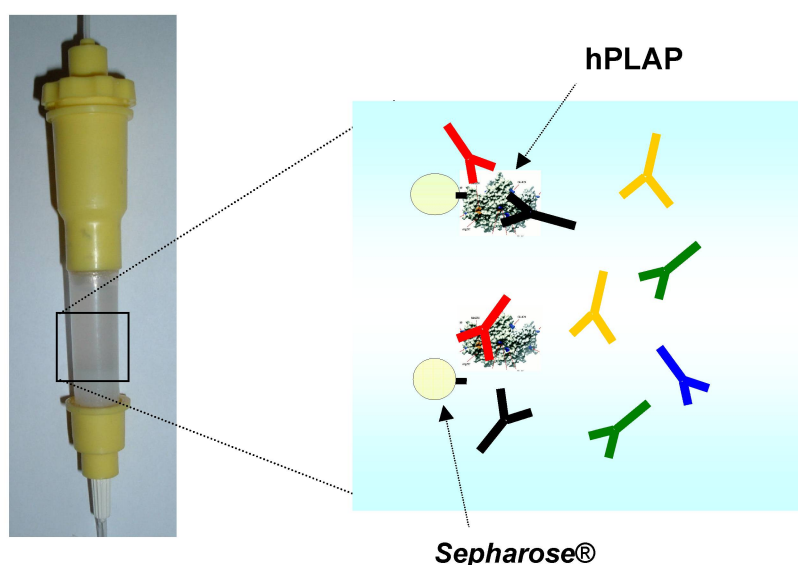
Para cada coluna, diluiu-se 0,3 ml da solução inicial da PLAP ou do peptídeo sintético em 1,9 ml de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4. O volume utilizado para a leitura de cada um dos sobrenadantes foi de 2,2 ml. Foi utilizado como branco 2,2 ml de tampão fosfato 0,2 M pH 7,4.

#### 4.3.3 Purificação de anticorpos anti-hPLAP

Após a extração com sulfato de amônio e diálise, as soluções com as imunoglobulinas foram eluídas em alíquotas de 7 ml diluídas em 13 ml de PBS 0,05M pH 7,4; a um fluxo de 20 ml/h, a 4°C, através da coluna de afinidade (figura 5) constituída por *Sepharose®* ligada covalentemente com a hPLAP (PORATH; AXÉN; ERNBACK, 1967; CUATRECASAS; WILCHEK; ANFINSEN, 1968; CUATRECASAS, 1970a). Cada fração foi eluída por 3 vezes pela coluna. As imunoglobulinas que não apresentaram afinidade pelo ligante (antígeno), foram recolhidas em tubos de 15 ml e desprezadas. Os anticorpos específicos anti-hPLAP ficaram ligados ao complexo *Sepharose®*-hPLAP.

A coluna foi lavada com PBS 0,05 M, pH 7,4; para eliminar as substâncias inespecíficas. Foram separadas alíquotas de 10 ml da solução de lavagem (PBS) e quantificadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 280 nm, utilizando-se como branco PBS 0,05 M, pH 7,4. Quando a absorbância da solução de lavagem apresentou resultado igual ao branco, foi iniciada a eluição dos anticorpos ligados ao complexo *Sepharose*®-hPLAP, através da mudança de pH.

FIGURA 5 – COLUNA DE AFINIDADE *SEPHAROSE*®-PLAP



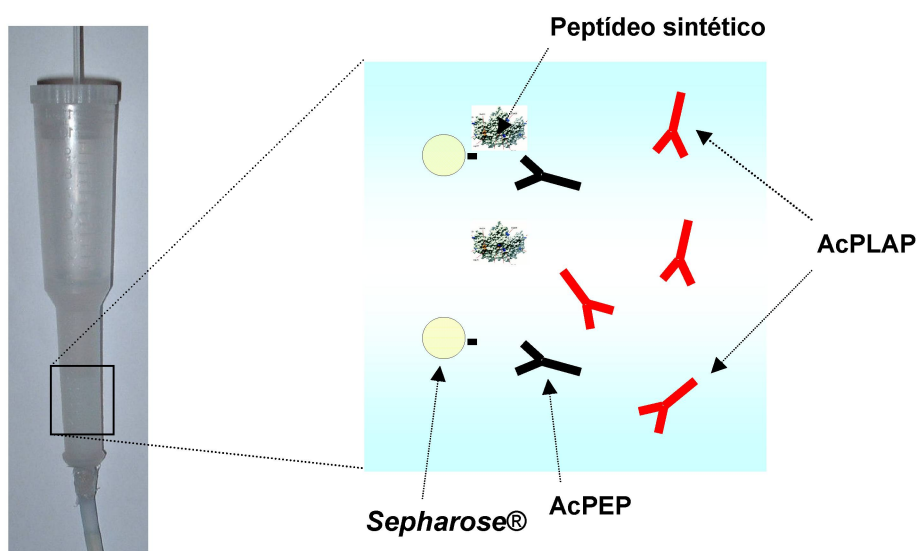
NOTAS: vermelho e preto - anticorpos policlonais anti-hPLAP, ligaram-se ao antígeno e ficaram retidos na coluna de afinidade; verde, azul e alaranjado - anticorpos inespecíficos, não se ligaram ao antígeno e foram eluídos com PBS.

A ligação entre o antígeno (hPLAP) e os anticorpos específicos (anti-hPLAP) foi desfeita com eluição por glicina-HCl, pH 2,8 (TSANG; WILKINS, 1991). As imunoglobulinas foram recolhidas em alíquotas de 3 ml e quantificadas em espectrofotômetro a 280 nm. As alíquotas com as maiores concentrações de anticorpos foram selecionadas e transferidas em membrana de celulose para diálise, previamente fervidas. O conteúdo destas membranas foi dialisado em PBS 0,05 M, pH 7,4; por 12 a 16 horas, sob agitação, a 4°C, para a retirada de glicina e reversão do pH.

#### 4.3.4 Purificação de anticorpos anti-peptídeo sintético (AA 57-71 da hPLAP)

Os anticorpos policlonais anti-hPLAP obtidos na primeira coluna incluem aqueles que reconheceram diferentes epítomos da enzima. Para isolar apenas a fração das imunoglobulinas que reconheceram a seqüência desejada, as soluções contendo os anticorpos anti-hPLAP foram eluídas pela coluna de *Sepharose*<sup>®</sup> - peptídeo sintético (AA 57-71 da hPLAP), a um fluxo de 20 ml/h, a 4°C. Cada fração foi eluída por quatro vezes pela coluna. As imunoglobulinas que não apresentaram afinidade pelo peptídeo sintético (AcPLAP), foram recolhidas durante a lavagem com PBS 0,05M, pH 7,4; e foram separadas para quantificação e desenvolvimento do ensaio ICA-PLAP.

FIGURA 6 – COLUNA DE AFINIDADE *SEPHAROSE*<sup>®</sup>-PEPTÍDEO SINTÉTICO



NOTAS: preto - anticorpos que reconheceram o peptídeo sintético (AcPEP), utilizados para sensibilização da microplaca do teste ICA-PEP; vermelho - anticorpos que não reconheceram o peptídeo (AcPLAP), utilizados para sensibilização da microplaca do teste ICA-PLAP.

Os anticorpos que reconheceram o peptídeo sintético AA 57-71 (AcPEP), ficaram ligados ao complexo *Sepharose*<sup>®</sup>-peptídeo. A ligação entre o antígeno (peptídeo sintético) e os anticorpos específicos (AcPEP) foi desfeita com eluição por glicina-HCl, pH 2,8. As imunoglobulinas foram recolhidas em alíquotas de 3 ml e quantificadas em espectrofotômetro a 280 nm. As alíquotas com as maiores



concentrações de anticorpos foram selecionadas e transferidas em membrana de celulose para diálise, previamente fervidas. O conteúdo destas membranas foi dialisado em PBS 0,05 M, pH 7,4; por 12 a 16 horas, sob agitação, a 4°C, para a retirada de glicina e reversão do pH. Os anticorpos AcPEP foram separados para quantificação e desenvolvimento do ensaio ICA-PEP.

#### 4.3.5 Quantificação das imunoglobulinas

Após o término da diálise, as soluções contendo anticorpos anti-hPLAP e anti-peptídeo sintético AA 57-71 foram quantificadas pelo coeficiente de extinção, sendo absorbância igual a 1,0 (280 nm) equivalente a 1,4 mg de IgG. A absorbância encontrada foi multiplicada por 1,4 para obter o resultado em mg/ml (BROWN, 1980). As soluções foram separadas em alíquotas de 0,5 ml e armazenadas em freezer a - 80°C, para posterior padronização do ensaio.

#### 4.4 AMOSTRAS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR). Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelo paciente, indivíduos do grupo controle ou responsável legal foram coletadas amostras de sangue sem anticoagulante ou foram preparados os homogeneizados de tecidos de pacientes com tumor adrenocortical e de placenta, para a realização do imunoensaio.

Após retração do coágulo, o sangue foi centrifugado por 10 minutos, a 3.500 rpm, e o soro foi separado em alíquotas de 1 ml e armazenado a -80°C até realização dos testes.

Foram macerados e homogeneizados 0,5 a 1g de cada amostra de tecido congelado (tumor adrenocortical ou placenta) em tampão PBS (0,05 M, pH 7,4 e 0,05% de *Tween 20*, a 4°C), imediatamente antes de incubar com os anticorpos. A solução resultante de cada amostra foi centrifugada a 4°C, por 30 minutos a 4000 rpm (WILLIAMS; McLAUGHLIN; JOHNSON, 1986).

#### 4.4.1 Grupo controle

Foram coletadas amostras de sangue de 100 voluntários para padronização dos imunoensaios.

Do total de voluntários, 7/100 eram grávidas com idade entre 24 e 35 anos e idade gestacional variando entre 12 e 37 semanas. Foi preparada uma mistura com os soros de 5/7 gestantes, com resultados preliminarmente determinados pelo método bioquímico comercial após inativação pelo calor a 65°C por 10 minutos (item 4.7).

Noventa e três das 100 amostras foram obtidas de doadores voluntários de sangue aparentemente saudáveis, do Banco de Sangue do HC-UFPR, com idade entre 19 e 57 anos, sendo 39 do sexo feminino e 54 do sexo masculino. Devido à influência do tabagismo sobre a expressão de PLAP-símile (KOSHIDA *et al.*, 1990), as amostras do banco de sangue foram estratificadas, sendo 45 indivíduos não fumantes, 14 fumantes ocasionais (menos de 15 cigarros por dia) e 35 fumantes (mais de 15 cigarros por dia).

#### 4.4.2 Pacientes oncológicos

Foram coletadas três amostras de sangue de uma criança de 10 anos com carcinoma embrionário de ovário, atendida na oncopediatria do HC-UFPR. Uma amostra foi obtida antes do início do tratamento com antineoplásicos e duas amostras 7 e 14 dias após o início da quimioterapia.

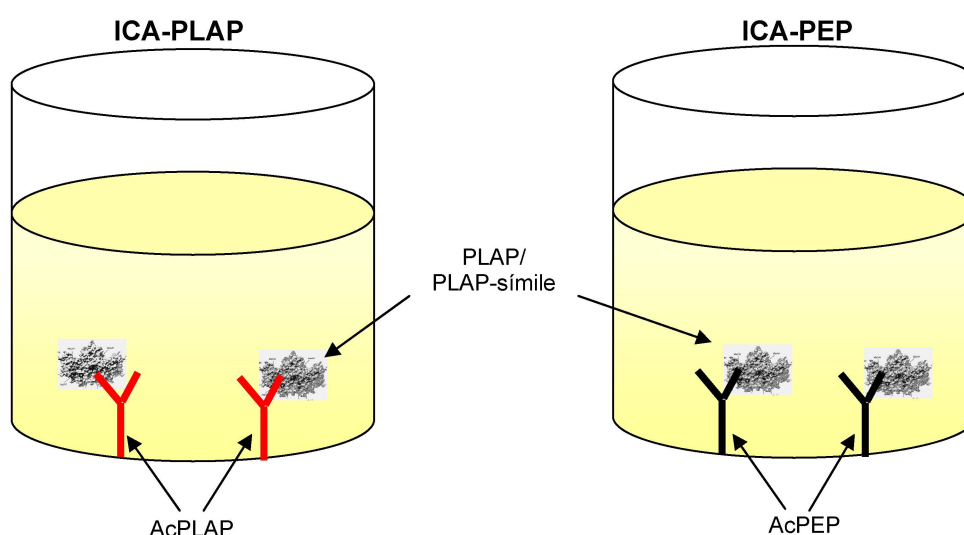
Foram analisadas 22 amostras de tecido retiradas cirurgicamente de 22 crianças com TCA.

### 4.5 DESENVOLVIMENTO DOS IMUNOENSAIOS ICA-PLAP E ICA-PEP

Foram desenvolvidos dois imunoensaios para determinar a atividade catalítica da PLAP/PLAP-símile (ICA), um imunoensaio empregando os anticorpos purificados com a coluna de afinidade *Sepharose*®-PLAP (ICA-PLAP) e um imunoensaio empregando os anticorpos purificados através da coluna de afinidade *Sepharose*®-peptídeo (ICA-PEP) (CEMBROWSKI; SULLIVAN; HOFER, 2000). Os ensaios se

basearam na sensibilização de uma microplaca de poliestireno (suporte sólido) com anticorpos purificados. Na primeira etapa, a PLAP/PLAP-símile da amostra reage com o anticorpo. A microplaca é lavada para retirar o excesso de amostra e o substrato p-nitrofenilfosfato é adicionado. Em seguida, acrescenta-se NaOH para bloquear a reação e a leitura da absorbância do produto colorido (amarelo) formado pela ação catalítica da enzima é realizada em 405 nm (figura 7).

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS IMUNOENSAIOS ICA-PLAP E ICA-PEP



NOTAS: AcPLAP – anticorpos de ovelha purificados com hPLAP; AcPEP – anticorpos de ovelha purificados com peptídeo sintético AA 57-71 da hPLAP; os anticorpos estão fixados em microplaca de poliestireno (suporte sólido); a cor amarela é produto da degradação do p-nitrofenilfosfato em p-nitrofenol pelas enzimas PLAP/PLAP-símile.

#### 4.5.1 Determinação da concentração dos anticorpos para sensibilização das microplacas e faixa de linearidade dos ensaios

Para determinar o título dos anticorpos para sensibilização das microplacas, foram realizadas diluições de anti-PLAP e anti-peptídeo e o ensaio foi realizado conforme descrito a seguir:

1. Duas microplacas de poliestireno com 96 cavidades (12 colunas x 8 linhas) foram sensibilizadas com 100 µl (para cada poço) dos anticorpos dissolvidos em tampão carbonato pH 9,6 (tampão de ligação), por um

período entre 12 e 16 horas, a 4°C. A primeira microplaca foi sensibilizada com os anticorpos AcPLAP (ICA-PLAP) nas diluições 1:100 (colunas 1 a 3), 1:250 (colunas 4 a 6), 1:500 (colunas 7 a 9) e 1:1000 (colunas 10 a 12). A segunda microplaca foi sensibilizada com os anticorpos AcPEP (ICA-PEP), nas diluições 1:20, 1:50, 1:100 e 1:200.

2. Após incubação a 4°C, as microplacas foram lavadas por 2 ciclos com solução de lavagem (salina com *Tween 20* a 0,05%), em lavadora automática, para a retirada dos anticorpos que não aderiram à fase sólida.
3. A cada poço sensibilizado das microplacas, foram pipetados 100 µl de uma solução de bloqueio contendo caseína a 2% em PBS 0,05 M, pH 7,4; com o objetivo de preencher os sítios das cavidades onde não houve aderência do anticorpos.
4. A microplaca foi incubada por uma hora, em estufa, a 37°C.
5. Após a incubação, a microplaca foi lavada por 2 ciclos com solução de lavagem, em lavadora automática, e o líquido restante nas cavidades foi retirado por inversão da microplaca em papel absorvente.
6. Foram realizadas diluições da hPLAP comercial (Sigma-Aldrich, 11 U/mg), partindo-se de uma solução estoque de 3 g/l em água destilada (armazenada em alíquotas de 20 µl congeladas a -80°C) para obter atividades enzimáticas (em U/l) correspondentes a: 11; 5,5; 2,75; 1,38; 0,69; 0,34; e 0,17. Nas duas microplacas, foram pipetados 100 µl de cada diluição em cada poço das linhas “A” até “G”, respectivamente e 100 µl do TI em cada poço da fileira “H”, considerado ponto zero.
7. As microplacas foram incubadas por uma hora, em estufa, a 37°C.

8. Após a incubação, as microplacas foram lavadas por 5 ciclos com solução de lavagem, em lavadora automática, e o líquido restante nas cavidades foi retirado por inversão da placa em papel absorvente.
9. A cada poço das microplacas foram pipetados 100 µl do substrato p-nitrofenilfosfato de sódio 60 mmol/l e fenol 50 mmol/l, diluído em tampão dietanolamina pH 10,4; EDTA 2 mmol/l, sulfato de zinco 1,2 mmol/l, acetato de magnésio 2,5 mmol/l, azida sódica 8 mmol/l.
10. A microplaca foi incubada por 5 horas para o ICA-PLAP e por 18 horas para o ICA-PEP, em estufa, a 37°C.
11. A reação foi bloqueada com adição de 50 µl de solução de NaOH 3 mol/l em cada poço.
12. Foi realizada a leitura da absorbância em leitora automática, com filtro de leitura em 405 nm e filtro de referência em 620 nm.

#### 4.5.2. Sensibilidade

A sensibilidade, ou seja, a menor atividade enzimática que os ensaios puderam detectar, estatisticamente diferente de zero, foi avaliada com hPLAP comercial (Sigma-Aldrich), conforme descrito a seguir:

1. Duas microplacas de poliestireno com 96 poços foram sensibilizadas com 100 µl (para cada poço) dos anticorpos dissolvidos em tampão carbonato pH 9,6 (tampão de ligação), por um período entre 12 e 16 horas, a 4°C. A primeira microplaca foi sensibilizada com os anticorpos AcPLAP (ICA-PLAP) na diluição 1:1000. A segunda microplaca foi sensibilizada com os anticorpos AcPEP (ICA-PEP), na diluição 1:50.
2. Após incubação a 4°C, as microplacas foram lavadas por 2 ciclos com solução de lavagem (salina com *Tween 20* a 0,05%), em lavadora

automática, para a retirada dos anticorpos que não aderiram à fase sólida.

3. A cada poço sensibilizado das microplacas, foram pipetados 100 µl de uma solução de bloqueio contendo caseína a 2% em PBS 0,05M, pH 7,4; com o objetivo de preencher os sítios das cavidades onde não houve aderência do anticorpos.
4. A microplaca foi incubada por uma hora, em estufa, a 37°C.
5. Após a incubação, a microplaca foi lavada por 2 ciclos com solução de lavagem, em lavadora automática, e o líquido restante nos. poços foi retirado por inversão da microplaca em papel absorvente.
6. Foram realizadas diluições da hPLAP comercial (Sigma-Aldrich, 11 U/mg), para obter atividades enzimáticas (em U/l) correspondentes a: 3,44; 1,72; 0,86; 0,43; 0,21; 0,11; 0,05; 0,03; 0,01; 0,007 e 0,002.
7. Nas duas microplacas, foram pipetados nas linhas “A” a “G”, em ordem decrescente de atividade enzimática, 100 µl de cada diluição da PLAP. Na fileira “H”, foram pipetados 100 µl do TI para o ponto zero.
8. As microplacas foram incubadas por 1 hora, em estufa, a 37°C.
9. Após a incubação, as microplacas foram lavadas por 5 ciclos com solução de lavagem, em lavadora automática, e o líquido restante nas cavidades foi retirado por inversão da placa em papel absorvente.
10. A cada poço das microplacas, foram pipetados 100 µl do substrato p-nitrofenilfosfato de sódio 60 mmol/l e fenol 50 mmol/l, diluído em tampão dietanolamina pH 10,4; EDTA 2 mmol/l, sulfato de zinco 1,2 mmol/l, acetato de magnésio 2,5 mmol/l, azida sódica 8 mmol/l.

11. A microplaca foi incubada por 5 horas para o ICA-PLAP e por 18 horas para o ICA-PEP, em estufa, a 37°C (foi observada uma discreta degradação do substrato para o ensaio ICA-PEP em 5 horas).
12. A reação foi bloqueada com adição de 50 µl de solução de NaOH 3 mol/l em cada poço.
13. Foi realizada a leitura da absorbância em leitora automática, com filtro de leitura em 405 nm e filtro de referência em 620 nm.

#### 4.5.3. Especificidade dos ensaios e quantificação da mistura de amostras de soro de gestantes

Após determinação da diluição dos anticorpos, foi determinada a especificidade dos ensaios empregando hPLAP (Sigma-Aldrich) e IAP (Calzyme) comerciais purificadas, e a mistura de amostras de soro de gestantes foi quantificado, conforme descrito a seguir:

1. Duas microplacas de poliestireno com 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos anti-PLAP e anti-peptídio conforme descrito previamente (item 4.5.2).
2. Foram realizadas diluições da hPLAP comercial (Sigma-Aldrich, 11 U/mg), para obter atividades enzimáticas (em U/l) correspondentes a: 33; 27,5; 13,75; 6,88; 3,44; 1,72; 0,86; 0,43; 0,21; 0,11; e 0,05. Foram realizadas diluições da IAP comercial (Calzyme; 0,55 U/mg), partindo-se de uma solução estoque de 1 g/l em água destilada (armazenada em alíquotas de 20 µL congeladas a -80°C) para obter atividades enzimáticas (em U/l) correspondentes a: 55; 27,5; 13,75; 6,88; 3,44; 1,72; 0,86; 0,43; 0,21; 0,11; e 0,05; cada diluição da IAP foi separada em duas alíquotas e uma das alíquotas foi inativada pelo calor a 65°C, por 10 minutos.

3. Foram realizadas diluições seriadas de uma mistura de amostras de soro de gestantes de 1:2 a 1:2048.
4. Nas duas microplacas, foram pipetados nas colunas um a 11, em ordem decrescente de atividade enzimática, 100 µl de cada diluição da PLAP, nas linhas “A” e “B”, 100 µl de cada diluição da IAP não inativada pelo calor, nas linhas “C” e “D”, 100 µl de cada diluição da IAP inativada pelo calor, nas linhas “E” e “F”, na coluna 12 foi pipetado 100 µl do TI para o ponto zero.
5. Nas linhas “G” e “H”, foram pipetados 100 µl da mistura de amostras de soro de gestantes sem diluir, e diluído de 1:2 a 1:2048 nas colunas 1 a 12, respectivamente.
6. O imunoensaio foi realizado conforme descrito previamente (item 4.5.2).

#### 4.5.4 Precisão

A reprodutibilidade foi avaliada através dos coeficientes de variação (CV) intra e inter-ensaio, utilizando-se os valores encontrados na mistura de amostras de soro de gestantes diluídos 1:8 e 1:64, correspondendo a uma atividade enzimática de 5,5 e 0,75 U/l para o ensaio ICA-PLAP e 4,8 e 0,98 U/l para o ensaio ICA-PEP.

O CV intra-ensaio foi calculado utilizando-se a média e o desvio padrão (DP) de 12 replicadas de cada diluição da mistura de amostras de soro obtidos de um mesmo ensaio. O CV inter-ensaio foi calculado utilizando-se 12 análises realizadas para cada uma das diluições realizadas em diferentes ocasiões.

#### 4.5.5 Exatidão

A exatidão dos ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP foi avaliada através dos resultados obtidos com o experimento da recuperação da hPLAP, cuja função é verificar que porcentagem da substância presente na amostra o método é capaz de identificar. Um ensaio está dentro dos padrões de qualidade quando apresenta



valores de recuperação entre 95 e 105%, já que a variação de  $\pm 5\%$  corresponde ao erro intrínseco do método (CEMBROWSKI; SULLIVAN; HOFER, 2000).

A recuperação consiste na comparação entre os resultados obtidos antes e depois da adição de uma pequena alíquota do padrão concentrado na amostra a ser quantificada, não podendo esta alíquota exceder 10% do volume final (CEMBROWSKI; SULLIVAN; HOFER, 2000).

Para este experimento, foi utilizada a mistura de amostras de soro de gestantes diluída 1:8 e 1:64, com atividade correspondente a 5,5 U/l e 0,75 U/l para o ensaio ICA-PLAP e 4,8 e 0,98 U/l para o ensaio ICA-PEP, respectivamente e um padrão de hPLAP de 165 U/l. Para que o volume adicionado à amostra não ultrapassasse o limite de 10  $\mu$ l, foram adicionados 7  $\mu$ l do padrão, totalizando um volume final de 107  $\mu$ l por poço (tabela 8).

TABELA 8 – PREPARO DE AMOSTRAS PARA OBTENÇÃO DOS DADOS DE RECUPERAÇÃO DOS ENSAIOS ICA-PLAP E ICA-PEP

AMOSTRA	ICA-PLAP		ICA-PEP		VOLUME ( $\mu$ l)
Diluição da mistura de amostras de soro de gestantes	1:8	1:64	1:8	1:64	
Atividade catalítica de hPLAP na mistura de amostras de soro de gestantes (U/l)	5,5	0,75	4,8	0,98	100
hPLAP comercial adicionada (U/l)	1,15	1,15	1,15	1,15	7
Volume final					107

Os cálculos da recuperação foram realizados conforme as equações descritas a seguir.

EQUAÇÃO 1 – CÁLCULO DO VOLUME DO PADRÃO A SER ADICIONADO

$$VP = CA \times \frac{(VP+VA)}{CP}$$

FONTE: CEMBROWSKI; SULLIVAN; HOFER, 2000.

NOTAS: CA – concentração adicionada; CP – concentração do padrão; VP – volume do padrão; VA – volume da amostra.

EQUAÇÃO 2 – CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO RECUPERADA

$$CR = \text{concentração pós-adição} - \text{concentração pré-adição}$$

FONTE: CEMBROWSKI; SULLIVAN; HOFER, 2000.

NOTA: CR – concentração recuperada.

## EQUAÇÃO 3 – CÁLCULO DA PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO

$$\text{Porcentagem de recuperação} = \frac{\text{CR}}{\text{CA}} \times 100$$

FONTE: CEMBROWSKI; SULLIVAN; HOFER, 2000.

NOTAS: CR – concentração recuperada; CA – concentração adicionada.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA PLAP/PLAP-SÍMILE NOS GRUPOS CONTROLE E PACIENTES ONCOLÓGICOS PELOS MÉTODOS ICA-PLAP E ICA-PEP

As amostras, padrões e controles foram analisados em duplicata conforme padronização dos ensaios. Para o ensaio ICA-PLAP, a microplaca foi sensibilizada com anticorpos anti-PLAP na diluição 1:1000 (0,16 µg/poço), as amostras e o padrão de PLAP foram incubados por uma hora, a 37°C. Após a lavagem, foi adicionado o substrato e a microplaca foi incubada por 5 horas a 37°C. A reação foi bloqueada com NaOH e a microplaca foi lida em leitora automática em filtro 405 nm (leitura)/620 nm (referência).

Para o ensaio ICA-PEP, a microplaca foi sensibilizada com anticorpos anti-peptídeo na diluição 1:50 (1,84 µg/poço) e as amostras e o padrão de PLAP foram incubados por uma hora a 37°C. Após a lavagem, foi adicionado o substrato e a microplaca foi incubada por 18 horas a 37°C. A reação foi bloqueada com NaOH e a microplaca foi lida em leitora automática em filtro 405 nm (leitura)/620 nm (referência).

##### 4.6.1 PLAP/PLAP-símile em doadores de sangue e cálculo do valor de corte para indivíduos não fumantes, fumantes ocasionais e fumantes

As amostras de 93 doadores de sangue foram descongeladas a temperatura ambiente e analisadas em duplicatas nos ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP. Como controle positivo, foi utilizada uma mistura de amostras de soro de gestantes. Resultados maiores que 0,1 U/l foram repetidos em duplicatas. Foi analisada a correlação entre os ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP para os 93 doadores e foi estabelecido um valor de corte para os indivíduos fumantes e não fumantes.

#### 4.6.2 PLAP/PLAP-símile em gestantes

As amostras de soro das sete gestantes foram analisadas em duplicata nos ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP. Foram realizadas quantificações em amostras não inativadas e inativadas pelo calor (65°C, 10 min), para verificar possível queda da atividade catalítica na amostra inativada. Os resultados foram comparados com a quantificação de ALP total realizada em equipamento automatizado, através do método bioquímico comercial (Labtest Diagnóstica) (item 4.7).

#### 4.6.3 PLAP/PLAP-símile em pacientes oncológicos

As amostras de soro da paciente com carcinoma embrionário de ovário foram analisadas em duplicatas nos ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP e os homogeneizados de TCA foram analisados em duplicatas no ensaio ICA-PLAP. Como controle positivo de cada teste, foi utilizada uma mistura de amostras de soro de gestantes e de homogeneizado de placenta, em duplicatas.

Amostras de soro dos pacientes com atividade enzimática acima do valor de corte foram inativadas pelo calor (65 °C, 10 min), repetidas em duplicatas inativadas e não inativadas, para verificar possível perda da atividade catalítica na amostra inativada.

### 4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS ALPS TOTAIS PELO MÉTODO BIOQUÍMICO

As fosfatases alcalinas totais foram determinadas pelo método bioquímico segundo BOWERS e McCOMB (1975), em equipamento automatizado, com *Kit* comercial (Labtest Diagnóstica). Foram analisados, os padrões comerciais de hPLAP (Sigma-Aldrich) e IAP (Calzyme) para verificar a atividade catalítica (U/mg) das enzimas, e soro de gestantes, para comparar com o ICA.

Foram preparadas diluições de 3000 µg/l e 1000 µg/l da hPLAP e de 100.000 µg/l e 50.000 µg/l da IAP. As diluições foram analisadas em triplicatas.

As amostras de soro de gestantes e da mistura de amostras foram analisadas em triplicatas, sem (ALPs totais) e com inativação prévia (ALPs termoestáveis) do soro em banho-maria a 65°C, por 10 minutos.

Em pH alcalino, as fosfatases alcalinas hidrolisam o substrato p-nitrofenilfosfato em p-nitrofenol e fosfato. O p-nitrofenol produzido tem absorbância máxima em 405 nm, e o resultado é diretamente proporcional a atividade enzimática da fosfatase alcalina na amostra (BOWERS; McCOMB; UPRETTI, 1981).

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística, os cálculos para correlação entre os ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP, assim como os gráficos, foram feitos com o auxílio do programa *Statística* (versão 6), utilizando o teste t de Student, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para a verificação da significância da diferença entre as medianas dos grupos e o teste de correlação de Pearson para estabelecer a correlação entre os ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP em doadores de sangue.

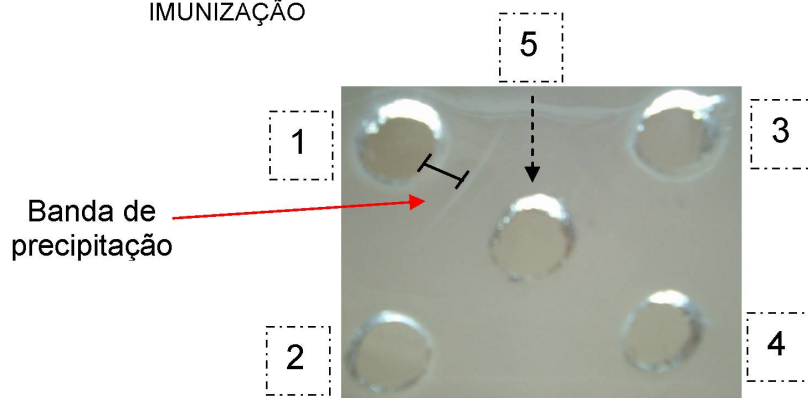
## 5 RESULTADOS

### 5.1 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-PLAP HUMANA

#### 5.1.1 Confirmação da imunização

Vinte e quatro horas após a incubação do soro na lâmina de imunodifusão dupla, verificou-se uma banda de precipitação no ágar no poço 1 contendo soro puro, indicando imunização do animal após a quinta injeção do antígeno e ausência de banda de precipitação no poço 4, onde foi pipetado soro pré-imunização (figura 8).

FIGURA 8 – RESULTADO DA IMUNODIFUSÃO DUPLA COM SORO DE OVELHA PRÉ E PÓS-IMUNIZAÇÃO



NOTAS: 1, 2 e 3 - soro pós-imunização 1:1 (soro puro), 1:2 e 1:4, respectivamente; 4 - soro pré-imunização; 5 - hPLAP 1mg/ml (antígeno); foi observada banda de precipitação no poço 1.

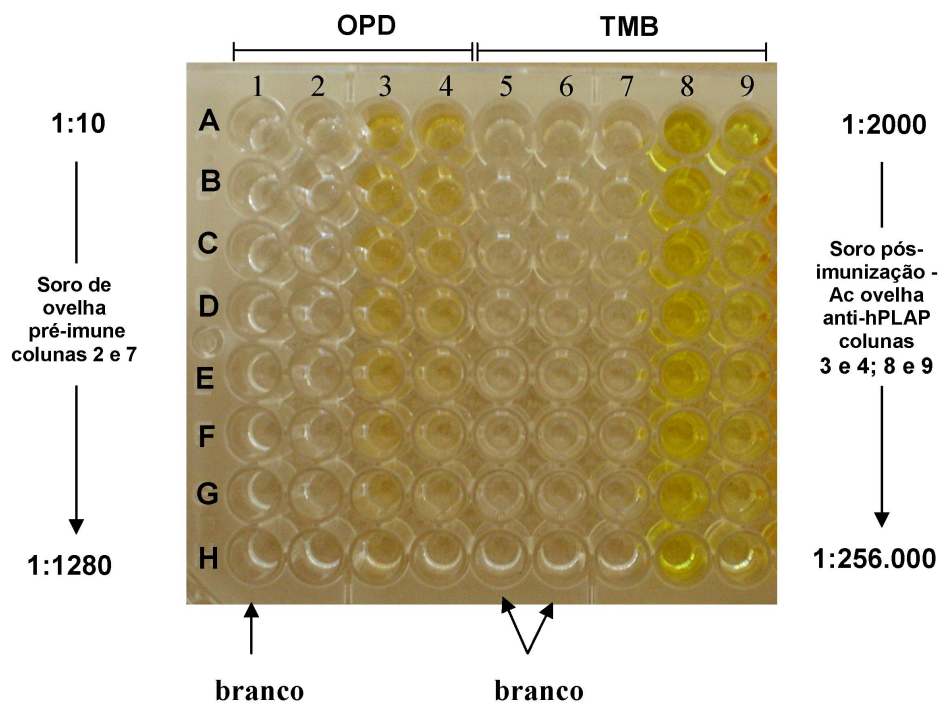
#### 5.1.2 ELISA Indireto

O título dos anticorpos anti-hPLAP produzidos após a sétima imunização, foi determinado por ELISA indireto.

Com o cromógeno OPD e conjugado diluído 1:2000, a absorbância encontrada em 492/620 nm foi de 1,452 para o soro diluído 1:2000 e de 0,150 para o soro diluído 1:256000, enquanto o soro pré-imunização apresentou uma absorbância de 0,056. Com o cromógeno TMB e conjugado diluído 1:4000, a absorbância encontrada em 450/620 nm foi de 2,313 para o soro diluído 1:2000 e de 1,238 para o

soro diluído 1:256.000, enquanto o soro pré-imunização apresentou uma absorbância de 0,024 (figura 9). Estes resultados comprovaram a imunização adequada do animal.

FIGURA 9 – TITULAÇÃO DE ANTICORPOS DE OVELHA ANTI-hPLAP POR ELISA INDIRETO



NOTA: OPD e TMB – cromógenos; branco – tampão de incubação; colunas 3 e 8 – conjugado de jumento anti-IgG de ovelha diluído 1:2000; colunas 4 e 9 – conjugado de jumento anti-IgG de ovelha diluído 1:4000.

## 5.2 PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS

### 5.2.1 Síntese do peptídeo

O peptídeo correspondente à seqüência dos AA 57-71 da hPLAP, apresentou 90% de pureza de acordo com análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massa, realizadas pela equipe do Dr. Luiz Juliano Neto do Departamento de Biofísica da UNIFESP.

### 5.2.2 Percentual de ligação da hPLAP e do peptídeo sintético à *Sepharose®*

A leitura da absorbância em 280 nm da solução de hPLAP inicial foi de 0,221, correspondendo a 5,160 do total de hPLAP adicionado, ao passo que a leitura obtida com o sobrenadante foi de 0,653, correspondendo a 1,930 no volume total. O percentual de ligação da hPLAP conjugada à *Sepharose®* foi de 62,6%, ou seja, 12,5 mg de hPLAP ligaram à *Sepharose®*.

Para a coluna de afinidade do peptídeo sintético o percentual de ligação foi de 95,7%, ou seja, 21,9 mg do peptídeo ligaram à *Sepharose®*.

### 5.2.3 Quantificação das imunoglobulinas

Após a purificação por cromatografia de afinidade, as soluções dos anticorpos foram quantificadas. A concentração dos anticorpos policlonais anti-hPLAP obtida foi de 1,6 mg/ml e para os anticorpos anti-peptídeo AA 57-71, a concentração obtida foi de 0,92 mg/ml.

## 5.3 DESENVOLVIMENTO DOS IMUNOENSAIOS ICA

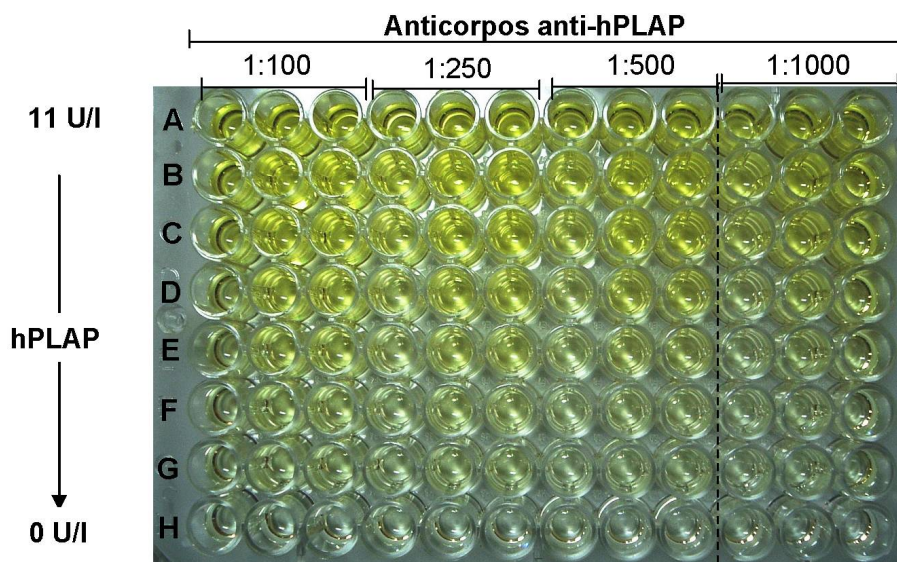
### 5.3.1 Determinação da concentração dos anticorpos para sensibilização das microplacas e da faixa de linearidade dos ensaios

No ensaio ICA-PLAP, os anticorpos anti-hPLAP foram diluídos de 1:100 a 1:1000, o antígeno (hPLAP comercial, Sigma-Aldrich) com atividades catalíticas de 11 a 0,17 U/l foi adicionado nas linhas "A" a "G" e o tampão de incubação foi adicionado na fileira H como ponto correspondendo a 0 U/l. O mesmo procedimento foi realizado para o ensaio ICA-PEP, modificando-se a diluição dos anticorpos anti-peptídeo de 1:20 a 1:2000.

O tempo de incubação com o substrato foi de 5 horas para o ICA-PLAP e de 18 horas para o ICA-PEP. O ensaio ICA-PEP foi incubado por 18 horas porque, após 5 horas, foi observada uma coloração insuficiente para leitura.

A absorbância média do ponto zero (em 405/620 nm) para ambos os ensaios foi de 0,164. Não houve diferença de coloração entre as diluições realizadas para os anticorpos anti-PLAP, porém a diluição 1:1000 (0,16 µg/poço), foi escolhida por proporcionar um maior rendimento do anticorpo (figura 10).

FIGURA 10 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO IDEAL DE ANTICORPOS ANTI-hPLAP PARA OS ENSAIOS ICA



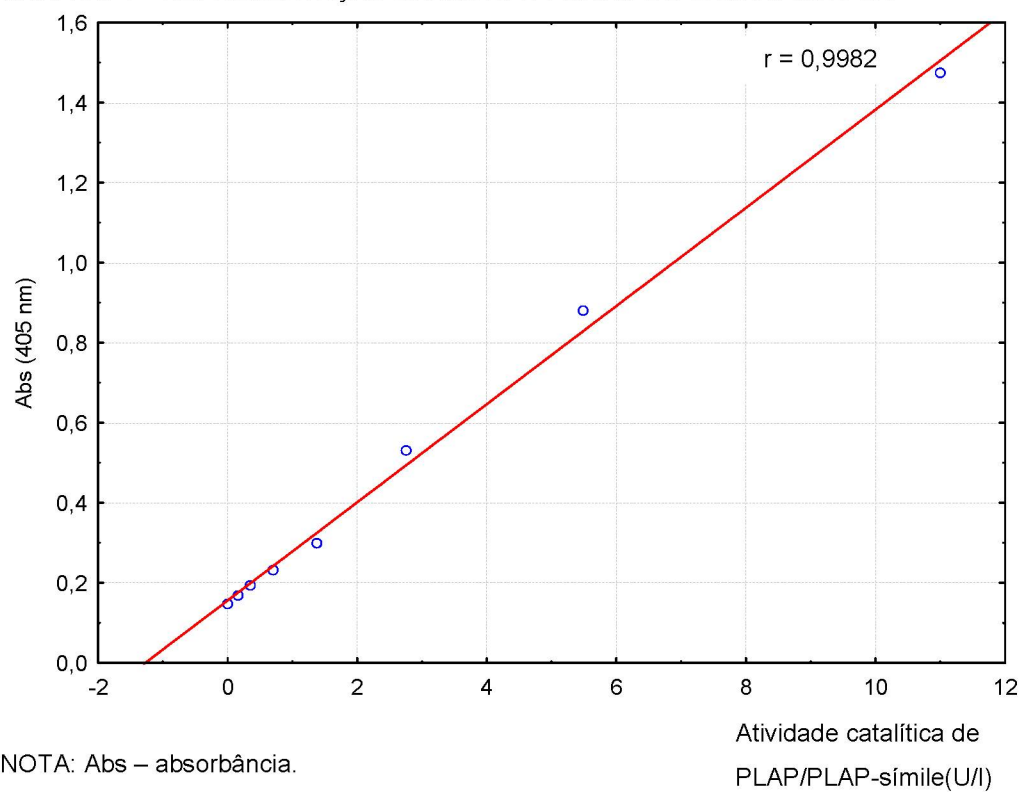
NOTA: amarelo - cor do produto final (p-nitrofenol) da atividade catalítica da hPLAP.

No ensaio ICA-PEP, foi utilizado o mesmo critério do ensaio ICA-PLAP. A diluição 1:50 (1,84 µg/poço) dos anticorpos anti-peptídeo, embora igual à diluição 1:20 foi escolhida por proporcionar um maior rendimento do anticorpo. As diluições maiores apresentaram saturação do anticorpo no ponto 5,5 U/I e não foram utilizadas.

A curva para os ensaios ICA-PLAP (gráfico 1) e ICA-PEP (gráfico 2) foi linear em atividades catalíticas de hPLAP variando de 0,1 a 11 U/I. Posteriormente, foi verificado que valores superiores a 11 U/I (13,75 U/I; 27,5 U/I e 33 U/I), encontraram-se fora da faixa de linearidade. Portanto, resultados acima de 11 U/I foram diluídos e novamente analisados.

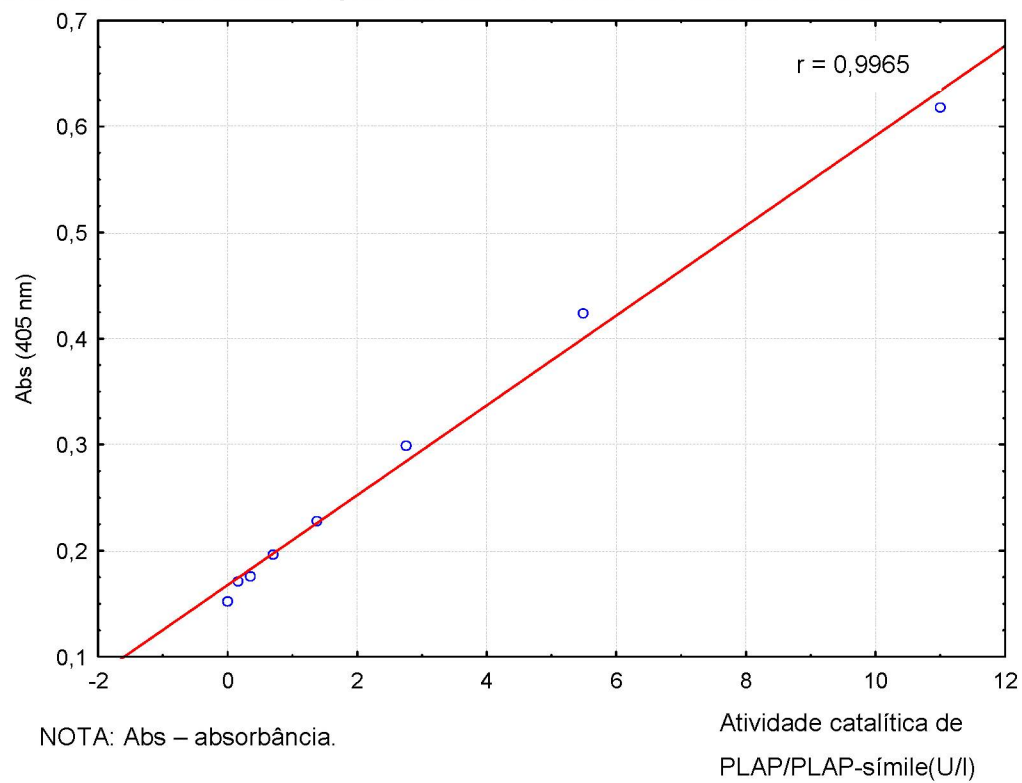


GRÁFICO 1 – REPRESENTAÇÃO DA CURVA PADRÃO DO ENSAIO ICA-PLAP



NOTA: Abs – absorbância.

GRÁFICO 2 – REPRESENTAÇÃO DA CURVA PADRÃO DO ENSAIO ICA-PEP



NOTA: Abs – absorbância.

### 5.3.2 Sensibilidade

A sensibilidade, menor atividade enzimática que os ensaios puderam detectar, estatisticamente diferente de zero, foi avaliada com diluições da hPLAP de 3,44 a 0,002 U/l. Foram utilizados dois critérios para determinar a sensibilidade dos ensaios, o teste t de *Student* entre as absorbâncias dos pontos em relação ao ponto 0 U/l, e a média das absorbâncias do ponto 0 U/l, acrescida de quatro desvios padrão (DE BROE; POLLET, 1988). A menor atividade enzimática detectada, estatisticamente diferente de zero ( $p < 0,001$ ), foi igual a 0,1 U/l para ambos os ensaios.

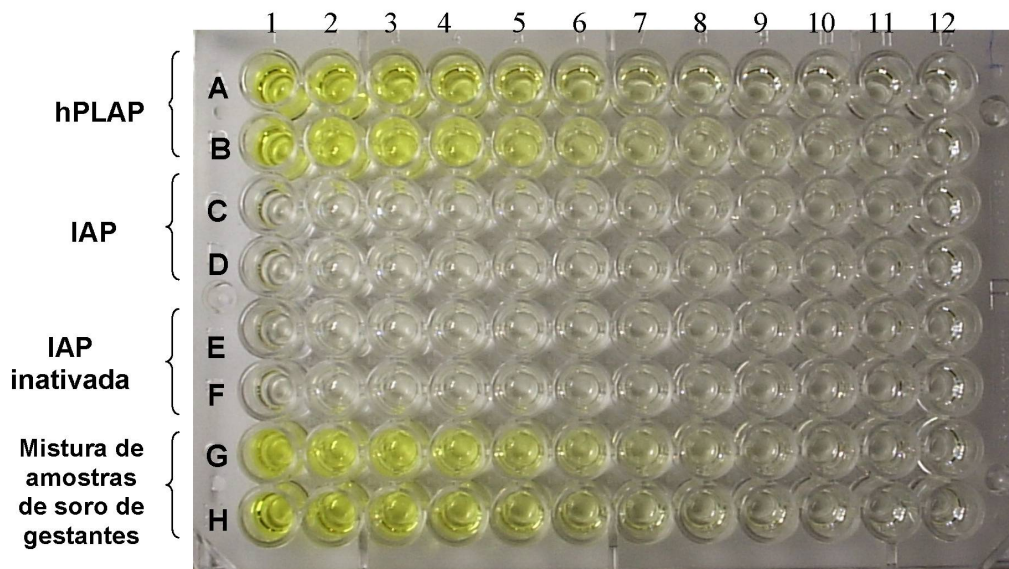
### 5.3.3 Especificidade dos ensaios e quantificação da mistura de amostras de soro de gestantes

A especificidade foi avaliada com diluições da IAP comercial (Calzyme) inativada e não inativada pelo calor. No ensaio ICA-PLAP, foi observada uma atividade enzimática de 1,22 U/l, 0,75 U/l e 0,1 U/l, nas diluições de IAP não inativadas correspondentes a 55 U/l (100 mg/l), 27,5 U/l (50 mg/l) e 13,75 U/l (25 mg/l), respectivamente (figura 11). Nas diluições de IAP inferiores a 13,75 U/l, não foi observada atividade enzimática, fato também verificado em todas as diluições de IAP inativadas pelo calor.

No ensaio ICA-PEP, foi observada uma atividade enzimática de 0,4 U/l com a diluição de IAP não inativada correspondente a 55 U/l (100 mg/l) (figura 12). Não foi observada atividade enzimática nas diluições inferiores de IAP e, semelhante ao ensaio ICA-PLAP, em todas as diluições de IAP inativada pelo calor.

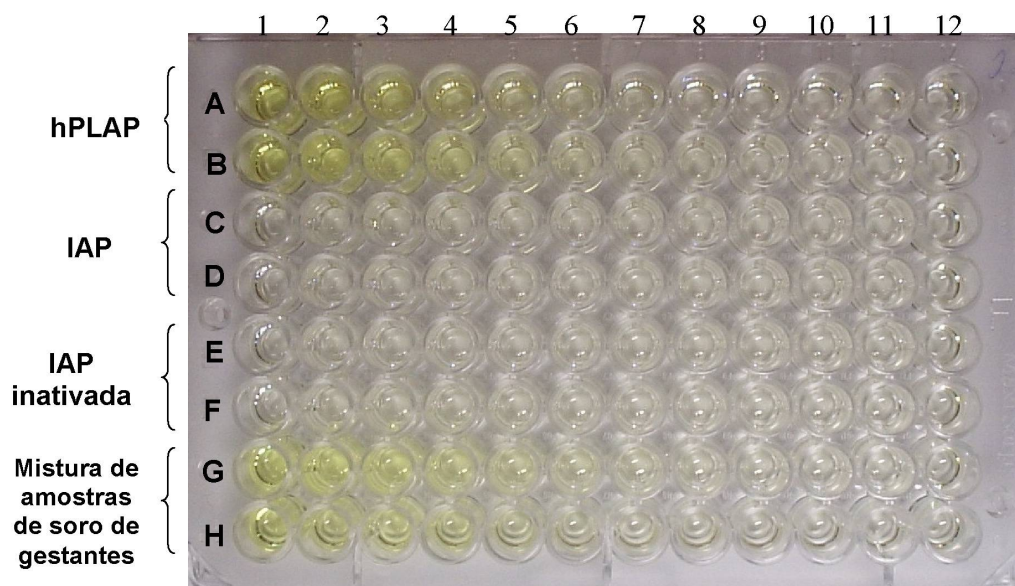
No ensaio ICA-PLAP, a mistura de amostras de soro de gestantes apresentou resultados de atividade enzimática entre 5,1 U/l e 0,15 U/l, nas diluições 1:8 a 1:256, respectivamente. Os resultados foram superiores a 11 U/l no soro puro, diluições 1:2 e 1:4, e inferiores a 0,1 U/l nas diluições 1:512 e 1:1024 (figura 11). No ensaio ICA-PEP, a mistura de amostras de soro de gestantes apresentou resultados de atividade enzimática entre 5,2 U/l e 0,14 U/l, nas diluições 1:8 a 1:256, respectivamente. Os resultados foram superiores a 11 U/l no soro puro, diluições 1:2 e 1:4, e inferiores a 0,1 U/l nas diluições 1:512 e 1:1024 (figura 12).

FIGURA 11 – ESPECIFICIDADE DO ENSAIO ICA-PLAP



NOTAS: amarelo - cor do produto final (p-nitrofenol) da atividade catalítica da hPLAP; colunas 1 a 11 – diluições com atividades catalíticas decrescentes; coluna 12 - 0 U/l (tampão de incubação); hPLAP - diluição de 33 U/l a 0,05 U/l; IAP - diluição de 55 U/l a 0,05 U/l; IAP inativada pelo calor (65°C, 10 min) - diluição de 55 U/l a 0,05 U/l; mistura de amostras de soro de gestantes - soro puro, diluição seriada de 1:2 a 1:1024.

FIGURA 12 – ESPECIFICIDADE DO ENSAIO ICA-PEP



NOTAS: amarelo - cor do produto final (p-nitrofenol) da atividade catalítica da hPLAP; colunas 1 a 11 – diluições com atividades catalíticas decrescentes; coluna 12 - 0 U/l (tampão de incubação); hPLAP - diluição de 33 U/l a 0,05 U/l; IAP - diluição de 55 U/l a 0,05 U/l; IAP inativada pelo calor (10 min, 65°C) - diluição de 55 U/l a 0,05 U/l; mistura de amostras de soro de gestantes - soro puro, diluição seriada de 1:2 a 1:1024.

### 5.3.4 Precisão

A reprodutibilidade dos ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP foi avaliada através dos coeficientes de variação (CVs) intra e inter-ensaio, na mistura de amostras de soro de gestantes diluídas 1:8 e 1:64. Para o ensaio ICA-PLAP os CVs intra e inter-ensaio foram de 6,5% e 9,9%, respectivamente, enquanto que para o ensaio ICA-PEP os CVs intra e inter-ensaio foram de 3,7 e 9% (tabelas 9 e 10).

TABELA 9 – COEFICIENTES DE VARIAÇÃO INTRA E INTER-ENSAIO DO MÉTODO ICA-PLAP

	n	MÉDIA (U/I)	DP	CV (%)
<b>CV intra-ensaio</b>				6,5 (média)
Mistura de amostras de soro de gestantes 1:8	12	5,5	0,12	5,9
Mistura de amostras de soro de gestantes 1:64	12	0,75	0,04	7
<b>CV inter-ensaio</b>				9,9 (média)
Mistura de amostras de soro de gestantes 1:8	12	5,11	0,51	9,9
Mistura de amostras de soro de gestantes 1:64	12	0,72	0,07	9,8

NOTAS: n – número de amostras; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação.

TABELA 10 – COEFICIENTES DE VARIAÇÃO INTRA E INTER-ENSAIO DO MÉTODO ICA-PEP

	n	MÉDIA (U/I)	DP	CV (%)
<b>CV intra-ensaio</b>				3,7 (média)
Mistura de amostras de soro de gestantes 1:8	12	4,8	0,05	4,2
Mistura de amostras de soro de gestantes 1:64	12	0,98	0,01	3,1
<b>CV inter-ensaio</b>				9 (média)
Mistura de amostras de soro de gestantes 1:8	12	5,2	0,47	9,1
Mistura de amostras de soro de gestantes 1:64	12	1,09	0,1	8,9

NOTAS: n – número de amostras; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação.

### 5.3.5 Exatidão

A recuperação é utilizada para se determinar o grau de exatidão de um método analítico. Erros intrínsecos ao método são os responsáveis pelos valores de uma recuperação acima de 100%, sendo tolerável uma variação de  $\pm 5\%$ . A porcentagem de recuperação foi de 96,1 a 98,4%, para o ensaio ICA-PLAP, e de 97,2 a 102,9% para o ensaio ICA-PEP (tabela 11), estando dentro da variação tolerável ( $100 \pm 5\%$ ).

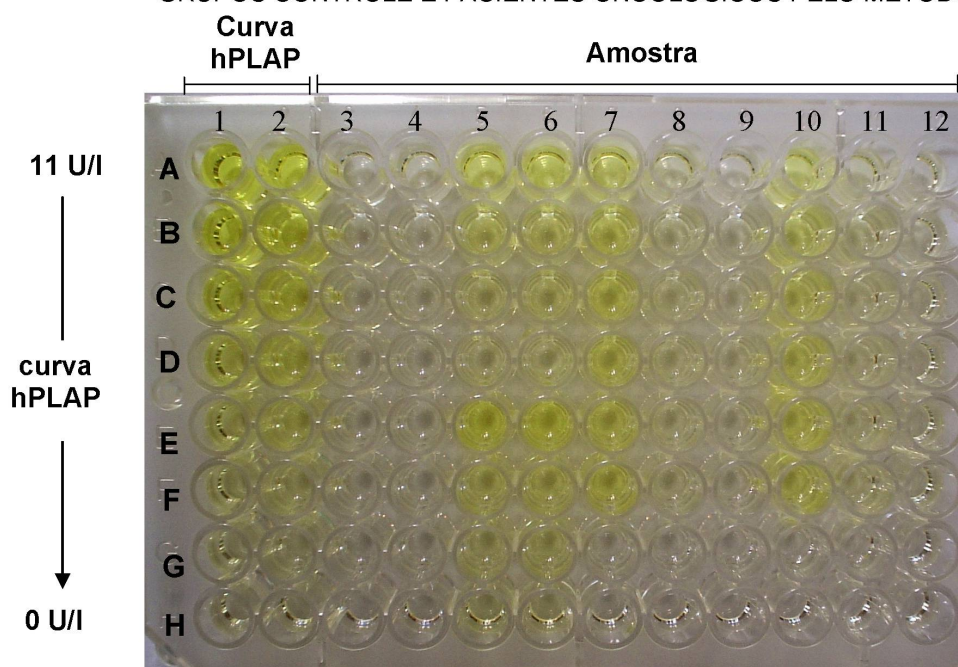
TABELA 11 – RECUPERAÇÃO DA hPLAP ADICIONADA À MISTURA DE AMOSTRAS DE SORO DE GESTANTES

AMOSTRA	ICA-PLAP		ICA-PEP	
Diluição da mistura de amostras de soro de gestantes	1:8	1:64	1:8	1:64
hPLAP da mistura de amostras de soro de gestantes (U/l)	5,5	0,75	4,5	0,6
hPLAP comercial adicionada (U/l)	1,15	1,15	1,15	1,15
Atividade recuperada (U/l)	1,11	1,13	1,12	1,18
Recuperação (%)	96,1	98,4	97,1	102,9

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DA PLAP/PLAP-SÍMILE NOS GRUPOS CONTROLE E PACIENTES ONCOLÓGICOS PELOS MÉTODOS ICA-PLAP E ICA-PEP

Depois da padronização dos ensaios, foram determinadas as atividades catalíticas da PLAP/PLAP-símile nos grupos controle e pacientes oncológicos. A figura 13 mostra um exemplo da determinação da atividade catalítica de PLAP/PLAP-símile pelo ensaio ICA-PLAP.

FIGURA 13 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA PLAP/PLAP-SÍMILE NOS GRUPOS CONTROLE E PACIENTES ONCOLÓGICOS PELO MÉTODO ICA-PLAP



NOTAS: amarelo - cor do produto final (p-nitrofenol) da atividade catalítica da hPLAP/PLAP-símile; colunas 3 e 4 – amostras de doadores de sangue (soro); colunas 5 a 9 – amostras de paciente com carcinoma embrionário de ovário (soro) e tumor adrenocortical (tecido); colunas 10, 11 e 12 - amostras de gestantes (soro).

#### 5.4.1 PLAP/PLAP-símile em doadores de sangue e cálculo do valor de corte para não fumante, fumante ocasional e fumante

Os resultados das amostras dos 93 doadores de sangue foram comparados com relação ao sexo e ao tabagismo. A tabela 12 mostra a distribuição entre os sexos e tabagismo, com maior prevalência de fumantes em indivíduos do sexo masculino (26/54, 48%). Foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para a verificação da significância da diferença entre as medianas de PLAP/PLAP-símile obtidas para não fumantes versus fumantes ocasionais (menos de 15 cigarros por dia) versus fumantes (mais de 15 cigarros por dia). Resultados de PLAP/PLAP-símile maiores que 0,1 U/l foram repetidos em duplicata. Os resultados individuais de cada doador estão registrados no apêndice 3.

TABELA 12 – DISTRIBUIÇÃO DE TABAGISMO POR SEXO EM DOADORES DE SANGUE

SEXO	NÃO FUMANTES	FUMANTES OCASIONAIS	FUMANTES	TOTAL
MASCULINO	22	6	26	54
FEMININO	22	8	9	39
TOTAL	44	14	35	93

NOTA: fumantes ocasionais - menos de 15 cigarros por dia; fumantes - mais de 15 cigarros por dia.

Não foi observada diferença significativa entre os sexos nos ensaios ICA-PLAP ( $p = 0,335$ ) e ICA-PEP ( $p = 0,209$ ). Com relação ao tabagismo, em ambos os ensaios foi observada uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre os indivíduos fumantes ( $0,40 \pm 0,353$  U/l, para ICA-PLAP;  $0,01 \pm 0,039$  U/l, para ICA-PEP) e não fumantes ( $0,06 \pm 0,119$  U/l, para ICA-PLAP;  $0,27 \pm 0,301$  U/l, para ICA-PEP). Entre os indivíduos não fumantes ( $n = 44$ ), os resultados variaram de 0 a 0,60 U/l e de 0 a 0,19 U/l nos ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP, respectivamente. Entre os fumantes ocasionais ( $n = 14$ ), os resultados variaram de 0 a 1,72 U/l e de 0 a 1,65 U/l nos ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP, respectivamente. Entre os fumantes ( $n = 35$ ) os resultados variaram de 0 a 1,20 U/l e de 0 a 1,00 U/l, para os ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP (tabela 13). Os resultados de PLAP/PLAP-símile dos doadores de sangue foram distribuídos em histogramas, de acordo com o tabagismo, para estabelecer o valor de corte dos ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP.



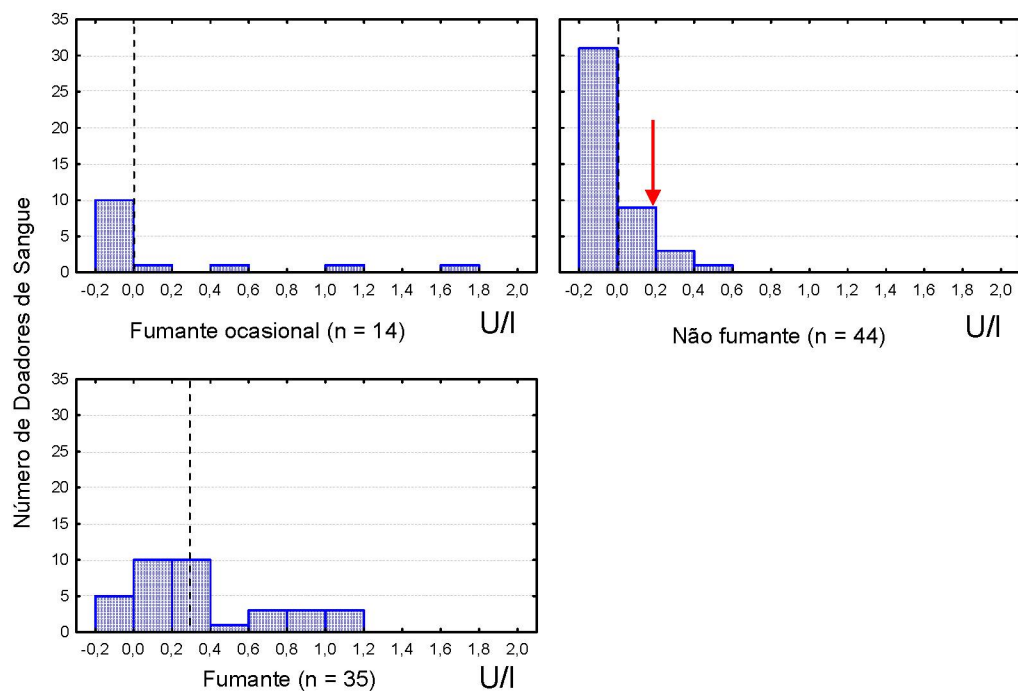
TABELA 13 – RESULTADOS DE PLAP/PLAP-SÍMILE EM DOADORES DE SANGUE

	n	AMPLITUDE (U/l)	MÉDIA (U/l)	MEDIANA (U/l)	DP
<b>Não Fumantes</b>	44				
ICA-PLAP		0 – 0,60	0,06	0,00	0,119
ICA-PEP		0 – 0,19	0,01	0,00	0,039
<b>Fumantes ocasionais</b>	14				
ICA-PLAP		0 – 1,72	0,25	0,00	0,525
ICA-PEP		0 – 1,65	0,20	0,00	0,489
<b>Fumantes</b>	35				
ICA-PLAP		0 – 1,20	0,40	0,29	0,353
ICA-PEP		0 – 1,00	0,27	0,23	0,301

NOTA: Fumantes ocasionais - menos de 15 cigarros por dia; fumantes - mais de 15 cigarros por dia;  
DP – desvio padrão.

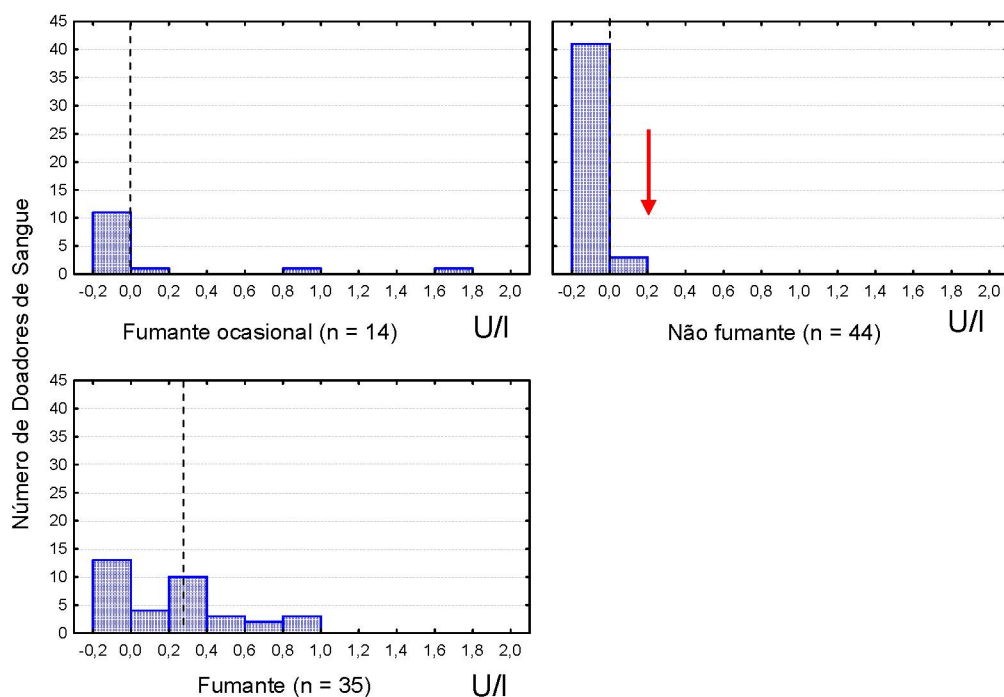
Como as concentrações de PLAP/PLAP-símile não seguem uma distribuição normal, optou-se por estabelecer um valor de corte acima da mediana, incluindo pelo menos 75% dos indivíduos. No ensaio ICA-PLAP, 40 (91%) dos indivíduos não fumantes e 11 (79%) fumantes ocasionais apresentaram resultados inferiores a 0,20 U/l, enquanto não se sabe qual a razão para os valores acima de 0,20 U/l. No ensaio ICA-PEP, 44 (100%) indivíduos não fumantes e 12 (86%) fumantes ocasionais apresentaram resultados inferiores a 0,20 U/l. Portanto, para não fumantes e fumantes ocasionais foi estabelecido um valor de corte igual a 0,20 U/l. A casuística limitada para fumantes (gráfico 3 para ICA-PLAP, e gráfico 4 para ICA-PEP), não permitiu estabelecer o valor de corte, acima do qual se possa suspeitar de outros fenômenos (como neoplasias) aumentando a atividade catalítica de PLAP/PLAP-símile, além do tabagismo. Sugere-se um corte acima de 0,40 U/l para os indivíduos fumantes, porém, esta avaliação merece ser interpretada com cautela após avaliação de uma amostragem maior.

GRÁFICO 3 – PLAP/PLAP-SÍMILE EM DOADORES DE SANGUE PELO MÉTODO ICA-PLAP



NOTAS: U/I – atividade catalítica de PLAP/PLAP-símile; n – número de doadores de sangue; fumante ocasional – menos de 15 cigarros por dia; fumante – mais de 15 cigarros por dia; linha pontilhada – mediana; seta vermelha – valor de corte.

GRÁFICO 4 – PLAP/PLAP-SÍMILE DOS DOADORES DE SANGUE PELO MÉTODO ICA-PEP



NOTAS: U/I – atividade catalítica de PLAP/PLAP-símile; n – número de doadores de sangue; fumante ocasional – menos de 15 cigarros por dia; fumante – mais de 15 cigarros por dia; linha pontilhada – mediana; seta vermelha – valor de corte.

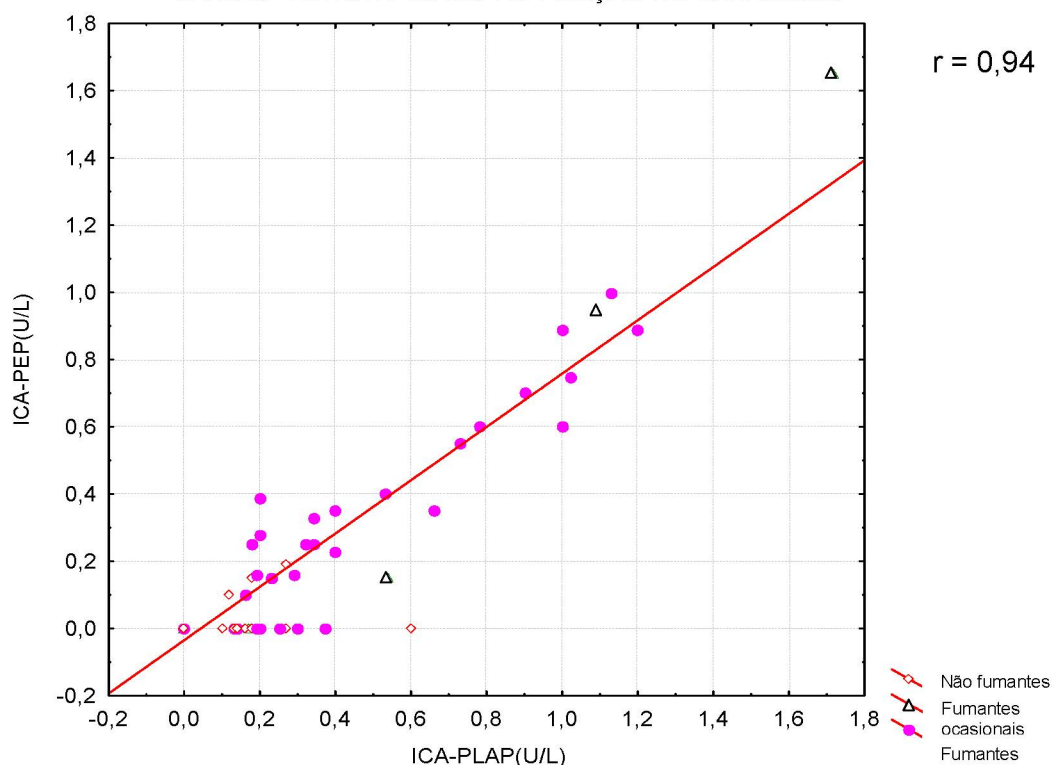


Foi analisada a correlação entre os ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP em doadores de sangue, utilizando a correlação de Pearson. O coeficiente de correlação ( $r$ ) entre os ensaios nos 93 doadores foi de 0,94. Para os não fumantes ( $n = 44$ ), fumantes ocasionais ( $n = 14$ ) e fumantes ( $n = 35$ ) os coeficientes de correlação foram  $r = 0,32$ ;  $r = 0,98$  e  $r = 0,93$ , respectivamente.

O coeficiente de correlação encontrado para os não fumantes foi baixo ( $r = 0,32$ ) pelo fato de 14 doadores de sangue que apresentaram resultado positivo ( $> 0,1$  U/l) para o ensaio ICA-PLAP e negativo para o ensaio ICA-PEP. Considerando o valor de corte igual a 0,2 U/l, o número de resultados discrepantes diminui para quatro.

Duas doadoras de sangue, fumantes ocasionais, com 45 e 53 anos, apresentaram concentrações séricas elevadas de PLAP/PLAP-símile em ambos os ensaios, com resultados de 1,72 e 1,65 U/l (45 anos), e de 1,09 e 0,95 U/l (53 anos), para os ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP, respectivamente (gráfico 5). Estas doadoras de sangue serão contactadas para esclarecimento dos resultados com nova avaliação quanto ao tabagismo e coleta de amostra para repetir os ensaios.

GRÁFICO 5 – CORRELAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS ICA-PLAP E ICA-PEP EM DOADORES DE SANGUE ESTRATIFICADO EM FUNÇÃO DO TABAGISMO



NOTAS: Fumantes ocasionais - menos 15 cigarros por dia; fumantes - mais de 15 cigarros por dia.

#### 5.4.2 Diferenças entre os resultados de atividade catalítica de PLAP em gestantes obtidas pelo método bioquímico comercial (LABTEST) e os ICAs

As amostras das gestantes foram analisadas em duplicata, utilizando soro não inativado e inativado pelo calor. Para comparação com os resultados do presente ensaio (ICA-PLAP ou ICA-PEP) foi realizada a quantificação das ALPs pelo método bioquímico automatizado empregando um *Kit* comercial (Labtest).

A inativação do soro pelo calor inibe as enzimas IAP e TNAP, resultando em valores baixos ou não detectáveis na quantificação de ALPs, exceto em gestantes que já produziram PLAP. Os resultados dos ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP variaram de 0,1 a 58 U/l, dependendo do tempo de gestação. Foram encontradas concentrações séricas insignificantes de PLAP na gestante com 12 semanas, concentrações baixas (1,58 a 2,5 U/l) na gestante com 18 semanas, e concentrações acima de 30 U/l nas demais gestantes (tabela 14). Os resultados dos imunoensaios foram semelhantes entre as amostras não inativadas e inativadas pelo calor.

As concentrações séricas das ALPs pelo método bioquímico automatizado, utilizando soro inativado pelo calor, foram superiores às obtidas nos imunoensaios ICA-PLAP e ICA-PEP, como mostra a tabela 14.

TABELA 14 – RESULTADOS DE ALPs E PLAP EM GESTANTES

GESTANTE	IDADE	IDADE GESTACIONAL (SEMANAS)	ALP TOTAL (U/l)*		ICA –PLAP (U/l)		ICA-PEP (U/l)	
			SNI	SI	SNI	SI	SNI	SI
1	35	12	77	1**	0,1	0,1	0,1	0,2
2	33	18	74	3	1,58	1,7	2	2,5
3	28	27	163	58	33	35,5	36	35,5
4	26	32	160	61	31	31	34	32
5	24	33	251	116	51,5	49	58	56
5	32	35	229	92	42	44	39	46
6	27	37	105	54	43	42	41	44

NOTAS: SNI - soro não inativado; SI – soro inativado (65°C, 10 min); \* método bioquímico automatizado com *kit* comercial Labtest; \*\* resultado fora da faixa de sensibilidade do método (sensibilidade: 2,4 U/l).

#### 5.4.3 PLAP/PLAP-símile em pacientes oncológicos

Para a validação dos ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP em pacientes oncológicos foram analisadas amostras de soro não inativado e inativado pelo calor, para excluir uma possível reação cruzada com as isoformas IAP e TNAP, e foram analisadas amostras de tecidos retirados cirurgicamente de crianças com TCA.

##### 5.4.3.1 Amostras de soro de criança com carcinoma embrionário de ovário

Foram colhidas 3 amostras de soro de uma criança de 10 anos, com carcinoma embrionário de ovário, apresentando uma massa abdominal visível e palpável do lado direito. Segundo a mãe, a massa existia inicialmente apenas na fossa ilíaca direita. Ao diagnóstico, a tomografia indicou um tumor extenso em todo abdômen, surgindo do ovário direito até a fossa ilíaca direita. Outras hipóteses diagnósticas foram excluídas, mas ainda não foi descartada a possibilidade do tumor ser um disgerminoma. A primeira amostra de soro foi obtida antes do tratamento com antineoplásicos, enquanto as duas amostras subseqüentes foram obtidas 7 e 14 dias depois do primeiro ciclo da quimioterapia. Os ensaios foram realizados em duplicatas, com amostras não inativadas e inativadas pelo calor (65°C, 10 min). No ensaio ICA-PLAP as médias das duplicatas não inativadas foram 9,5; 5,7 e 0,23 U/l, e 10,2; 5,6 e 0,25 U/l nas inativadas, na primeira, segunda e terceira amostras, respectivamente (gráfico 6 e tabela 15).

No ensaio ICA-PEP os resultados com as amostras não inativadas foram 9,3; 5,7 e 0,25 U/l e 9,3; 5,3 e 0,25 U/l nas inativadas, na primeira, segunda e terceira amostras, respectivamente (tabela 15).

A queda da concentração sérica de PLAP/PLAP-símile foi proporcional à diminuição do tamanho do tumor e a melhora clínica da paciente. Quando foi colhida a segunda amostra, o tumor já havia deixado de ser visível, e entre a segunda e terceira amostras, o tumor deixou de ser palpável. A investigação continuará com exames de imagens e novas determinações de PLAP/PLAP-símile para se determinar qual o menor tamanho do tumor que ainda produzirá enzima com atividade acima do valor de corte (0,2U/l). Não foi observada diferença (com  $p < 0,05$ )

entre as amostras inativadas e não inativadas, e entre os ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP, sugerindo ausência de reação cruzada.

GRÁFICO 6 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PLAP/PLAP-SÍMILE EM PACIENTE DE 10 ANOS COM CARCINOMA EMBRIONÁRIO DE OVÁRIO OBTIDAS PELO MÉTODO ICA-PLAP

ICA-PLAP (U/I)

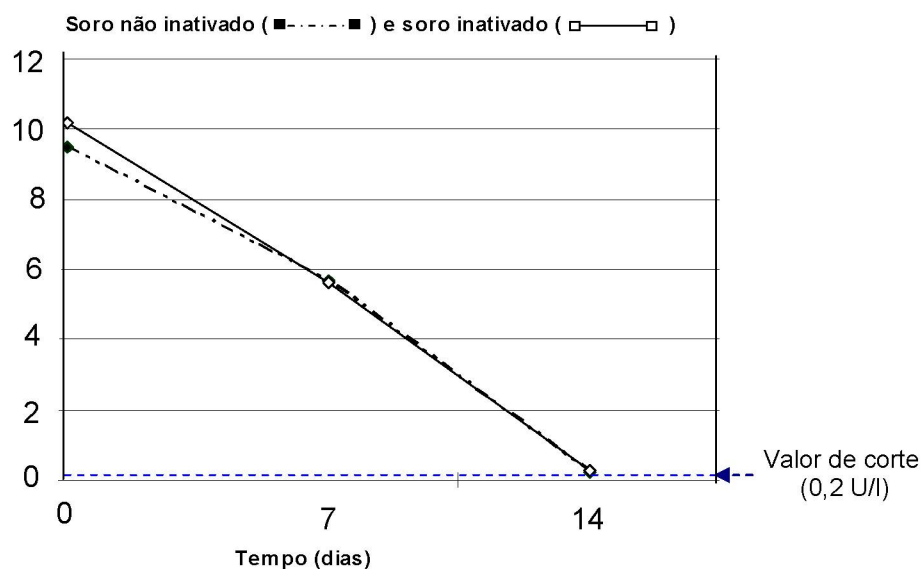


TABELA 15 – RESULTADOS DE PLAP/PLAP-SÍMILE EM PACIENTE DE 10 ANOS COM CARCINOMA EMBRIONÁRIO DE OVÁRIO OBTIDOS PELOS MÉTODOS ICA-PLAP E ICA-PEP

AMOSTRA	TEMPO DE TRATAMENTO (DIAS)	ICA -PLAP (U/L)*		ICA-PEP (U/L)*		TUMOR
		SNI	SI	SNI	SI	
1	0	9,5	10,2	9,3	9,3	Visível e palpável
2	7	5,7	5,6	5,7	5,3	Apenas palpável
3	14	0,23	0,25	0,25	0,25	Não visível e não palpável

NOTAS: SNI - soro não inativado; SI - soro inativado pelo calor (65°C, 10 min); \* médias de duplicatas; 0 - pré-tratamento.

#### 5.4.3.2 Amostras de tecido de pacientes com tumor adrenocortical

Para a validação dos imunensaios, foram analisadas amostras de placenta a termo e 22 amostras de tecido de 22 crianças com TCA. As concentrações de hPLAP no homogeneizado de placenta foram superiores a 5.000 U/I/mg de tecido.

As amostras teciduais de crianças com TCA foram preliminarmente avaliadas, sem inativação pelo calor, e sem considerar o peso exato de cada amostra. Dezessete (77%) amostras de TCA apresentaram atividades de PLAP/PLAP-símile entre 0,4 e 17 U/l. Estes resultados ainda deverão ser comparados com as determinações de PLAP/PLAP-símile em amostras séricas de indivíduos com TCA e indivíduos saudáveis, não sendo objetivo da presente pesquisa, apresentar uma avaliação sobre o possível significado de 77% de positividade para PLAP/PLAP-símile nas amostras de TCA.

## 6 DISCUSSÃO

O propósito inicial desta pesquisa foi desenvolver um imunoensaio de baixo custo, sensível e específico para detecção das fosfatases alcalinas hPLAP e PLAP-símile, no soro e em tecidos de tumor, visando seu uso futuramente em pacientes oncológicos, para diagnóstico de neoplasias primárias, recidivas e metástases, seguimento terapêutico e prognóstico, uma vez que não existe teste semelhante disponível no Brasil. Um *kit* comercial para 96 determinações de hPLAP foi encontrado na Bélgica, custando R\$ 2.100,00 (INNOTEST®hPLAP, <http://www.innogenetics.com/site/diagnostics.html>), sem considerar os custos para importação, o que inviabiliza seu uso laboratorial de rotina.

Os imunoensaios para PLAP não distinguem a isoforma PLAP-símile, mesmo utilizando anticorpos monoclonais, devido ao alto grau de homologia entre elas (98%) (LE DU *et al.*, 2001), e dependem da existência de anticorpos específicos e sensíveis. Anticorpos policlonais podem apresentar reação cruzada com a isoforma IAP (MALKIN *et al.*, 1978; MILLÁN; STIGBRAND, 1981), mas pode ser minimizada inativando-se as amostras pelo calor. Por outro lado, um anticorpo monoclonal, dependendo de qual epítipo reconheceria na proteína, poderia não detectar PLAP/PLAP-símile nas amostras devido ao seu grande de polimorfismo (existe pelo menos 48 subtipos de hPLAP e 10 de PLAP-símile), uma importante limitação à eficiência do ensaio (BECKMAN; BECKMAN, 1969; KAM *et al.*, 1985; MILLÁN; MANES, 1988; HENTHORN *et al.*, 1988; SMITH *et al.*, 1988; KOSHIDA *et al.*, 1990). Este estudo foi idealizado para diminuir os impactos das desvantagens apresentadas por anticorpos poli e monoclonais, produzindo e purificando através de duas colunas de afinidade (EY *et al.*, 1978). Foram obtidos dois grupos de anticorpos, um grupo reconhecendo várias partes da molécula de hPLAP (AcPLAP) e outro grupo reconhecendo apenas uma sequência de 15 aminoácidos (AA 57-71) de hPLAP (AcPEP) (YOUNG *et al.*, 1975), com o objetivo de aumentar a especificidade do ensaio.

Optou-se por utilizar os dois anticorpos em ensaios separados, o ICA-PLAP, com AcPLAP que reconheceu diferentes epítipos da hPLAP, para evitar o não reconhecimento de uma proteína proveniente de um gene polimórfico, e o ensaio

ICA-PEP, com AcPEP que reconheceu somente o epítopo AA 57-71, para refinar a especificidade do ensaio.

A sequência AA 57-71 específica da hPLAP, escolhida para ser sintetizada (peptídeo sintético), foi reconhecida por corresponder a uma alça livre da proteína, de fácil acesso para o anticorpo (figura 5). A estratégia em se utilizar um fragmento de uma molécula para a purificação de anticorpos policlonais, fornece um grupo de imunoglobulinas com comportamento de anticorpos monoclonais (YOUNG *et al.*, 1975; EY *et al.*, 1978; MOURA *et al.*, 2004), e com a vantagem de obter maiores quantidades do que os meios com hibridomas.

A faixa de linearidade do método, 0 a 11 U/l, é mais estreita do que a descrita na literatura, que relata valores variando de 0 a 20 U/l (McLAUGHLIN; GEE; JOHNSON, 1983). Entretanto, esta diferença não compromete a eficiência do ensaio, pois amostras com atividades de PLAP/PLAP-símile acima de 11 U/l foram diluídas e reavaliadas.

Para determinar a sensibilidade dos imunoenaios, foram realizadas diluições de hPLAP com valores de 3,44 a 0,002 U/L. A menor concentração detectada, estatisticamente diferente de zero (DE BROE; POLLET, 1988), foi de 0,1 U/l para os ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP, semelhante ao relatado na literatura para testes que utilizaram anticorpos monoclonais anti-hPLAP (McLAUGHLIN; GEE; JOHNSON, 1983; NOZAWA *et al.*, 1989).

A especificidade dos ensaios foi avaliada com IAP comercial (0,55 U/mg). No ensaio ICA-PLAP, foi observada reação cruzada ao se adicionar 50 µg/ml (equivalente a 27,5 U/l) de IAP, com valor medido de 0,75 U/l. No ensaio ICA-PEP, reação cruzada foi observada com 100 µg/ml de IAP, equivalente a 55 U/l e que correspondeu a um resultado de 0,4 U/l, o que seria obtido com apenas 36 ng/ml de PLAP, ou seja, com uma concentração cerca de 2800 vezes menor. Não foi observada atividade enzimática nas diluições inativadas de IAP em ambos os ensaios. Estes dados foram semelhantes aos encontrados por SHINODA *et al.* (1988), que observaram reação cruzada com anticorpos policlonais a partir de 22,50 U/l de IAP. Assim, é provável que a IAP seja incorporada na medida de PLAP/PLAP-símile (reação cruzada) apenas em concentrações superiores a 27,5 U/l. Como garantia adicional da especificidade, recomenda-se que amostras com concentrações alteradas de PLAP/PLAP-símile, sejam reavaliadas após inativação

do soro pelo calor. Resultados semelhantes entre o soro inativado e não inativado confirmam ausência das isoformas termolábeis IAP e TNAP.

A reprodutibilidade e exatidão dos imunoensaios foram avaliadas utilizando uma mistura de amostras de soro de gestantes com idade gestacional variando de 12 a 37 semanas. Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram de 6,5 e 9,9% para o ensaio ICA-PLAP, e de 3,7 e 9%, para o ensaio ICA-PEP. Os valores de CV relatados na literatura se encontram numa faixa semelhante aos obtidos (McLAUGHLIN; GEE; JOHNSON, 1983; HAIJE; VAN DRIEL; VAN DER BURG, 1987; DE BROE; POLLET, 1988; FISKEN *et al.*, 1989). A exatidão dos imunoensaios foi determinada pela porcentagem de recuperação, que variou de 96,1 a 98,4% para o ensaio ICA-PLAP e de 97,2 a 102,9% para o ensaio ICA-PEP. Os resultados se encontram dentro da variação tolerável ( $100\pm 5\%$ ) definida pela literatura (CEMBROWSKI; SULLIVAN; HOFER, 2000).

Depois da padronização dos imunoensaios, foram analisadas amostras de soro de 93 doadores voluntários de sangue que foram estratificadas em função do tabagismo. Foi verificada uma diferença significativa entre fumantes (mais de 15 cigarros/dia) e não fumantes em ambos os ensaios ( $p < 0,001$ ), semelhante ao citado por KOSHIDA *et al.* (1990). Entre os indivíduos não fumantes, as concentrações de PLAP/PLAP-símile variaram de 0 a 0,60 U/l e 0 a 0,19 U/l nos ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP, respectivamente. Os resultados observados em fumantes para o ensaio ICA-PLAP e em fumantes e não fumantes para o ensaio ICA-PEP foram semelhantes aos descritos por MUENSCH *et al.* (1986), que variaram de 0 a 0,14 U/l e 0 a 1,02 U/l para não fumantes e fumantes, respectivamente. As concentrações de PLAP/PLAP-símile observadas para os não fumantes no ensaio ICA-PLAP (figura 15) sugerem uma menor especificidade com relação ao ICA-PEP (figura 16), o que seria justificado pelo comportamento de anticorpo monoclonal do AcPEP.

Considerando que a finalidade do ensaio é fornecer parâmetros para interpretação dos resultados dos testes, o valor de corte para os ensaios em adultos foi determinado com relação aos resultados observados entre os doadores de sangue não fumantes. Como as concentrações de PLAP/PLAP-símile não seguiram uma distribuição normal, optou-se por estabelecer um valor de corte acima da mediana, incluindo pelo menos 75% dos indivíduos. Foi estabelecido um valor de corte de 0,20 U/l para os indivíduos não fumantes e fumantes ocasionais, que pode



ser ainda menor com amostras inativadas. O que se propõe é que toda amostra com atividade de PLAP/PLAP-símile superior a 0,1 U/l, seja reavaliada após a inativação pelo calor. Também se sugere a partir desta pequena casuística, um corte acima de 0,40 U/l para os indivíduos fumantes. Estudos posteriores com um número maior de indivíduos fumantes poderão estabelecer um valor de corte com maior precisão.

O coeficiente de correlação entre os ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP foi de 0,94. Analisando os doadores de sangue separadamente quanto ao tabagismo, a correlação observada para os não fumantes (0,32) foi devido aos resultados de 14 indivíduos que foram positivos ( $> 0,1$  U/l) para o ensaio ICA-PLAP e negativos para o ensaio ICA-PEP. Estes dados podem ser atribuídos a uma maior especificidade do ensaio ICA-PEP, pois os anticorpos reconhecem somente um epítipo de hPLAP. Entretanto, ressalta-se a importância de uma reavaliação de PLAP/PLAP-símile nos 14 pacientes.

Duas doadoras de sangue, fumantes ocasionais, com 45 e 53 anos, apresentaram concentrações séricas de PLAP/PLAP-símile em ambos os ensaios de 1,70 U/l e 1,02 U/l, respectivamente. Estas doadoras serão chamadas para nova avaliação. Após coleta de nova amostra e confirmação, elas serão encaminhadas para avaliação clínica com um oncologista, com o objetivo de se investigar a existência de neoplasia.

Sete amostras de soro de gestantes foram avaliadas na sua forma inativada e não inativada, quanto à atividade das ALPs totais pelo método bioquímico comercial (Labtest Diagnóstica) em equipamento automatizado (BOWERS Jr.; McCOMB; 1975), e quanto à atividade de PLAP/PLAP-símile pelos ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP. Os resultados dos imunoenaios variaram de 0,1 a 58 U/l, dependendo do tempo de gestação, e na gestante com 12 semanas, foram encontrados concentrações insignificantes de PLAP (0,1 U/l), valores semelhantes ao descrito em literatura (McLAUGHLIN; GEE; JOHNSON, 1983). Os valores encontrados nos imunoenaios foram semelhantes entre as amostras não inativadas e inativadas. As concentrações de ALPs encontradas no soro inativado, foram superiores aos obtidos nos imunoenaios, dados que sugerem uma inativação incompleta de IAP e TNAP e maior especificidade dos imunoenaios (tabela 14).

Uma validação parcial para determinação sérica da PLAP/PLAP-símile pelos ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP foi realizada com 3 amostras de uma criança com

carcinoma embrionário de ovário. A diminuição da concentração sérica de PLAP/PLAP-símile foi proporcional à diminuição do tamanho do tumor e à melhora clínica da paciente, o que sugere um bom prognóstico segundo KOSHIDA *et al.* (1996a,b). A diminuição de PLAP/PLAP-símile para concentrações próximas ao valor de referência, foram semelhantes aos casos descritos na literatura, que ocorreu 8 a 28 dias após o início do tratamento (MUENSCH *et al.*, 1986; HAIJE; VAN DRIEL; VAN DER BURG, 1987; KOSHIDA *et al.*, 1996). Foi um resultado extremamente confortante, principalmente para um hospital público (Hospital de Clínicas da UFPR) com limitação de despesas com tomografia, pois permitiu dar informação sobre o resultado satisfatória da quimioterapia e da possibilidade de cura, apesar de se tratar de um tumor extremamente grande.

Atividade catalítica de PLAP/PLAP-símile elevada em 17 de 22 (77%) TCA de crianças, avaliada pelo ensaio ICA-PLAP, confirmam os resultados reportados por RODRIGUES *et al.* (submetido) utilizando *Western Blotting*. O significado desta expressão de PLAP/PLAP-símile em TCA pediátrico reforça a hipótese de origem embrionária do tumor, diferente daquele que acomete pacientes adultos, conforme sugerido em estudo anterior (RODRIGUES *et al.*, submetido).

## 7 CONCLUSÕES

A realização deste projeto de pesquisa permitiu que fossem obtidas as conclusões abaixo relacionadas:

1. Os AcPLAP e AcPEP purificados por cromatografia de afinidade podem ser empregados para detecção de hPLAP/PLAP-símile.
2. Os ensaios ICA-PLAP e ICA-PEP detectam concentrações de hPLAP/PLAP-símile a partir de 0,1 U/l, apresentaram CV intra-ensaio de 6,5% e 3,7%, e CV inter-ensaio de 9,9% e 9%, respectivamente, e porcentagem de recuperação entre 96,1% a 102,9%.
3. O ensaio ICA-PEP é mais específico que o ensaio ICA-PLAP, devido ao comportamento de anticorpo monoclonal do AcPEP.
4. A reação cruzada ocorre somente com concentrações de IAP superiores a 27,5 U/l (50 µg/ml) no ensaio ICA-PLAP ou 55 U/l (100 µg/ml) no ensaio ICA-PEP.
5. Para aumentar a especificidade do teste, recomenda-se que as amostras de soro com atividades de hPLAP/PLAP-símile superiores a 0,1 U/l sejam inativadas pelo calor e novamente mensuradas.
6. Um indivíduo adulto saudável pode apresentar soro não inativado com atividade de PLAP/PLAP-símile de 0,2 U/l. Permanece a necessidade de se estabelecer o valor de corte para crianças e confirmar o valor de corte para fumantes, envolvendo um número maior de indivíduos.
7. Os ensaios se complementam e devem ser utilizados simultaneamente. Enquanto o ICA-PLAP permite o reconhecimento de uma proteína proveniente de um gene polimórfico, o ensaio ICA-PEP garante um resultado específico para determinar hPLAP/PLAP-símile.
8. Os imunoenaios desenvolvidos nesta pesquisa são adequados para a determinação de PLAP/PLAP-símile em soro e tecido de pacientes oncológicos.

## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Este projeto disponibiliza um ensaio que ainda não faz parte da rotina no diagnóstico e acompanhamento dos pacientes oncológicos, pela falta de um *Kit* comercial no Brasil. Assim, o CEGEMPAC pretende oferecer determinação da atividade catalítica de hPLAP/PLAP-símile em soro e tecidos de pacientes oncológicos atendidos no Hospital de Clínicas da UFPR, Hospital Erasto Gaertner – Liga Paranaense de Combate ao Câncer e Hospital Pequeno Príncipe. Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes serão utilizados na elaboração de estudos comparativos entre hPLAP/PLAP-símile e outros marcadores tumorais, para estabelecer o real valor deste MT.

No Paraná, o TCA tem uma incidência 30 vezes superior à relatada em literatura e um diagnóstico precoce pode aumentar significativamente as chances de cura. Assim, pretende-se também avaliar o uso de PLAP/PLAP-símile como marcador tumoral em pacientes com TCA, para diagnóstico de tumor primário, recidivas e metástases antes das elevações hormonais e aparecimento dos sintomas, seguimento de tratamento e significado no prognóstico.

## REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY: **Cancer Facts and Figures 2005**. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2005. Disponível em < [http://www.cancer.org/docroot/STT/stt\\_0.asp](http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_0.asp) > Acesso em: 23 dez. 2004.

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. **Affinity chromatography**. Principles and methods. Uppsal: Pharmacia LKB Biotechnology, 1993.

AMERSHAM BIOSCIENCES. **Antibody purification handbook**. Piscataway: Pharmacia & Upjohn, 2002.

BECKMAN, G.; BECKMAN, L. The placental phosphatase polymorphism: variations in Hawaiian subpopulations. **Hum Hered**, v. 19, p. 524-529, 1969.

BECKMAN, G.; BECKMAN, L.; HOLM, S.; SIKSTROM, C.; WENNERBERG, C. Placental alkaline phosphatase types and transplacental IgG transport. **Hum Hered**, v. 45, n. 1, p. 1-5, 1995.

BEN-ARIE, A.; HAGAY, Z.; BEN-HUR, H.; OPEN, M.; DGANI, R. Elevated serum alkaline phosphatase may enable early diagnosis of ovarian cancer. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, Limerick, v. 86, p. 69-71, 1999.

BEREK, J.S.; BAST JR, R.C. Ovarian cancer screening: the use of serial complementary tumor markers to improve sensitivity and specificity for early detection. **Cancer Suppl**, v. 75, n. 10, 1995.

BERNEY, M.D.; LEE, A.; RANDLE, S.J.; JORDAN, S.; SHAMASHI, J.; OLIVER, R.T.D. The frequency of intratubular embryonal carcinoma: implications for the pathogenesis of germ cell tumours. **Histopathol**, v. 45, p. 155-161, 2004.

BOSSI, M.; HOYLAERTS, M.F.; MILLÁN, J.L. Modifications in a flexible surface loop modulate the isozyme-specific properties of mammalian alkaline phosphatases. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 268, p. 25409-25416, 1993.

BOWERS Jr., G.N.; McCOMB, R.B. Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum. **Clin Chem**, v. 26, p. 1988-1995, 1975.

BOWERS, G.N.; McCOMB, R.B.; UPRETTI, A. 4-nitrophenyl phosphate-characterization of high-purity materials for measuring alkaline phosphatase activity in human serum. **Clin Chem**, v. 27 n. 1, p. 135-143, 1981.

BOYER, S.H. Alkaline phosphatase in human serum and placentae. **Science (Washington, DC)**, v. 134, p. 1002-1004, 1961.

BROWN, SB. **Ultraviolet and visible spectroscopy. An introduction to spectroscopy to biochemists**. London: Academic Press, p.14-69, 1980.

CEMBROWSKI, G.S.; SULLIVAN, A.M.; HOFER, T.L. Quality control and statistics. In: BISHOP, M.L.; DUBEN-ENGELKIRK, J.L.; FODY, E.P. **Clinical chemistry: principles, procedures, correlations**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 40-76.

CHEVILLE, J.C.; RAO, S.; ICZKOWSKI, K.A; LOHSE, C.M.; PANKRATZ, V.S. Cytokeratin expression in seminoma of the human testis. **Am J Clin Pathol**, v. 113, p. 583-588, 2000.

CUATRECASAS, P; WILCHEK, M.; ANFINSEN, C.B. Selective enzyme purification by affinity chromatography. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 61, n.2, p. 636-646, 1968.

CUATRECASAS, P. Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 245, n. 12, p. 3059-3065, 1970a.

CUATRECASAS, P. Agarose derivatives for purification of protein by affinity chromatography. **Nature**, London, v. 228, p. 1327-1328, 1970b.

DE BROE, M.E.; POLLET, D.E. Multicenter evaluation of human placental alkaline phosphatase as a possible tumor-associated antigen in serum. **Clin Chem**, v. 34, n.10, p. 1995-1999, 1988.

DESANDES, E.; CLAVEL, J.; BERGER, C.; BERNARD, J.L.; BLOUIN, P.; LUMLEY, L.; DEMEOCQ, F.; FREYCON, F.; GEMBARA, P.; GOUBIN, A.; LE GALL, E.; PILLON, P.; SOMMELET, D.; TRON, I.; LACOUR, B. Cancer incidence among children in France, 1990-1999. **Pediatr Blood Cancer**, v. 43, p. 749-757, 2004.

DIAS NETO, J.A.; DOMINGOS, A.L.A.; MARTINS, A.C.P.; TUCCI JR., S.; SUAID, H.J.; COLOGNA, A.J.; SCHNEIDER, C.B. Prognóstico de tumores testiculares germinativos. **Acta Cir Bras**, v. 17, supl. 3, p. 55, 2002.

DOMAR, U.; HIRANO, K.; STIGBRAND, T. Serum levels of human alkaline phosphatase isoenzymes in relation to blood groups. **Clin Chim Acta**, Amsterdam, v. 203, p. 305-314, 1991.

DURBIN, H.; MILLIGAN, E.M.; MATHER, S.J.; TUCKER, D.F.; RAYMOND, R.; BODMER, W.F. Monoclonal antibodies to placental alkaline phosphatase: preclinical evaluation in a human xenograft tumour model of F(ab')<sub>2</sub> and Fab fragments. **Int J Cancer Suppl**, n.2, p. 59-66, 1988.

ENGVALL, E.; PERLMAN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochem**, v. 8, p. 871-874, 1971.

ENGVALL, E. Enzyme immunoassay: ELISA and EMIT. **Methods Enzymol**, Orlando, v. 70-A, p. 419-439, 1980.

ERIKSSON, H.J.C.; SOMSEN, G.W.; HINRICHS, W.L.J.; FRIJLINK, H.W.; JONG, G.J. Characterization of human placental alkaline phosphatase by activity and protein assays, capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **J Chromatogr A**, Amsterdam, v. 755, p. 311-319, 2001.

FERGUSON, R.J.; FISKEN, J.; McINTYRE, M.A.; ROULSTON, J.E.; LEONARD, R.C.F. Measurement of placental alkaline phosphatase activity in benign and malignant pleural effusions. **J Clin Pathol**, London, v. 45, p. 1114-1115, 1992.

FIGUEIREDO, B.C.; STRATAKIS, C.A.; SANDRINI, R.; DELACERDA, L.; PIANOVSKY, M.A.; GITZAKIS, C.; YOUNG, H.M.; HADDAD, B.R. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 84, p. 1116-1121, 1999.

FIGUEIREDO, B.C.; ZAMBETTI, R.C.R.; HADDAD, B.; PIANOVSKY, M.D.; PEREIRA, R.M.; DELACERDA, L.; SANDRINI, R. Amplification of 9q34 in childhood adrenocortical tumors: a specific feature unrelated to ethnic origin or living conditions. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, p. 1217-1224, 2000.

FIGUEIREDO, B.C.; CAVALLI, L.R.; PIANOVSKI, M.A.; LALLI, E.; SANDRINI, R.; RIBEIRO, R.C.; ZAMBETTI, G.; DELACERDA, L.; RODRIGUES, G.A.; HADDAD, B.R. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 2, p. 615-619, 2005.

FIGUEIREDO, B.C.; SANDRINI, R.; ZAMBETTI, G.P.; PEREIRA, R.M.; CHENG, C.; LIU, W.; LACERDA, L.; PIANOVSKI, M.A.; MICHALKIEWICZ, E.; JENKINS, J.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; MASTELLARO, M.J.; VIANNA, S.; WATANABE, F.; SANDRINI, F.; ARRAM, S.I.B.; BOFFETTA, P.; RIBEIRO, R.C. Penetrance of adrenocortical tumors associated with the germline TP53 R337H mutation. **J Med Genet** (no prelo).

FISHMANN, W.H.; INGLIS, N.I.; KRANT, M.J. Serum alkaline phosphatase of intestinal origin in patients with cancer and with cirrhosis of the liver. **Clin Chim Acta**, Amsterdam, v. 12, p. 398-303, 1965.

FISHMAN, L.; MIYAYAMA, H.; DRISCOLL, S.G.; FISHMAN, W.H. Developmental phase-specific alkaline phosphatase isoenzymes of human placenta and their occurrence in human cancer. **Cancer Res**, Baltimore, v. 36, p. 2268-2273, 1976.

FISKEN, J.; LEONARD, R.C.; SHAW, G.; BOWMAN, A.; ROULSTON, J.E. Serum placental-símile alkaline phosphatase (PLAP): a novel combined enzyme linked Immunoassay for monitoring ovarian cancer. **J Clin Phatol**, London, v. 42, p. 40-45, 1989.

FOSFATASE ALCALINA LIQUIFORM: fosfatase alcalina total. Lagoa Santa: LABTEST Diagnóstica, 2001. Bula.

FORD, T.F.; BUTCHER, D.N.; SAMUELL, C.T.; MASTERS, J.R.W.; PARKINSON, M.C.; OLIVER, R.T.D. Serum and tissue tumour markers in seminomas. **Br J Urol**, v. 57, p. 750-754, 1985.

FREY, A.; MECKELEIN, B.; EXTERNEST, D.; SCHMIDT, M.A. A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-base substrate reagent fo enzyme-linked immunosorbent assays. **J Immunol Methods**, Amsterdam, v. 233, p. 47-56, 2000.

GOLDSTEIN, D.J.; ROGERS, C.E.; HARRIS, H. Expression of alkaline phosphatase loci in mammalian tissues. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 77, n. 5, p. 2857-2860, 1980.



GOLDSTEIN, D.J.; ROGERS, C.E.; HARRIS, H. Evolution of alkaline phosphatase in primates. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 79, p. 879-883, 1982.

GREENE, P.J.; SUSSMAN, H.H. Strutural comparison of ectopic and normal placental alkaline phosphatase. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 70, n. 10, p. 2936-2940, 1973.

GRIFFIN, C.A.; SMITH, M.; HENTHORN, P.S.; HARRIS, H.; WEISS, M.J.; RADUCHA, M.; EMANUEL, B.S. Human placental and intestinal alkaline phosphatase genes map to 2q34-q37. **Am J Hum Genet**, Chicago, v. 41, p. 1025-1034, 1987.

HAIJE, W.G.; VAN DRIEL, J.; VAN DER BURG, M.E.L. Catalytic and immunologic activities of placental-like alkaline phosphatase in clinical studies. The value of PLAP in follow-up of ovarian cancer. **Clin Chim Acta**, v. 165, p. 165-175, 1987.

HARMENBERG, U; FRODIN, J.E.; LJUNGDAHL-STAHLE, E.; MELLSTEDT, H.; WAHREN, B; STIGBRAND, T. Significance of alkaline phosphatase isozymes in the monitoring of patients with colorectal carcinoma. **Tumour Biol**, v. 10, n. 5, p. 225-231, 1989.

HENLEY, J.D.; YOUNG, R.H.; WADE, C.L.; ULBRIGHT, T.M. Seminomas with exclusive intratubular growth: a report of 12 clinically and grossly inconspicuous tumor. **Am J Surg Pathol**, v. 28, n. 9, 2004.

HENTHORN, P.S.; KNOLL, B.J.; RADUCHA, M.; ROTHBLUM, K.N.; SLAUGHTER, C.; WEISS, M.; LAFFERTY, M.A.; FISCHER, T.; HARRIS, H. Products of two common alleles at the locus for human placental alkaline phosphatase differ by seven amino acids. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 83, p. 5597-5601, 1986.

HENTHORN, P.S.; RADUCHA, M.; KADESCH, T.; WEISS, M.J.; HARRIS, H. Sequence and caracterization of the human intestinal alkaline phosphatase gene. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 263, n. 24, p. 12011-12019, 1988.

HOFFMANN, M.C.; JELTSCH, W.; BRECHER, J.; WALT, H. Alkaline phosphatase isozymes in human testicular germ cell tumor, their precancerous stage, and three related cell lines. **Cancer Research**, v. 49, p. 4696-4700, 1989.

HOYLAERTS, M.F.; MILLÁN, J.L. Site-direct mutagenesis and epitope-mapped monoclonal antibodies define a catalytically important conformational difference between human placental and germ cell alkaline phosphatase. **Eur J Biochem**, v. 202, p. 605-616, 1991.

HOYLAERTS, M.F.; MANES, T.; MILLÁN, J.L. Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 272, n. 36, p. 22781-22787, 1997.

HUSTIN, J.; COLLETTE, J.; FRANCHIMONT, P. Immunohistochemical demonstration of placental alkaline phosphatase in various states of testicular development and in germ cell tumors. **Int J Androl**, v. 10, p. 29-35, 1987.

ILLES, R.K.; IND, T.E.J.; CHARD, T. Production of placental alkaline phosphatase (PLAP) and PLAP-símile material by epithelial germ cell and non-germ cell tumors in vitro. **Br J Cancer**, v. 69, p. 274-278, 1994.

IMANISHI, H.; HADA, T.; MURATANI, K.; HIRANO, K.; HIGASHINO, K. Expression of a hybrid form of alkaline phosphatase isoenzyme in a newly established cell line (HuG-1) from a gastric cancer patient. **Cancer Res**, Baltimore, v. 50, p. 3408-3412, 1990.

IND, T.; ILES, R.; SHEPHERD, J.; CHARD, T. Serum concentrations of cancer antigen 126, placental alkaline phosphatase, cancer-associated serum antigen and free beta human chorionic gonadotrophin as prognostic markers for epithelial ovarian cancer. **Br J Obstetr Gynaecol**, v. 104, p. 1024-1029, 1997.

INMETRO. Sistema internacional de unidades (SI). Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/infotec/publicacoes/Si.pdf>> Acesso em: 01/fev./04.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA). Registro Hospitalar de Câncer – Relatório Anual 1994-1998. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/rhcdocsINCA\\_94\\_98.pdf](http://www.inca.gov.br/rhcdocsINCA_94_98.pdf)> Acesso em: 02/jan./05.

JACOBS, E.L.; HASKELL, M.C. Clinical use of tumor markers in oncology. **Curr Probl Cancer**, Chicago, v. 15, n. 6, p. 299-360, 1991.

JEPPSON, A.; WAHREN, B.; STIGBRAND, T.; EDSMYR, F.; ANDERSSON, L. A clinical evaluation of serum placental alkaline phosphatase in seminoma patients. **Br J Urol**, v. 55, p. -73-78, 1983.

KAM, W.; CLAUSER, E.; KIM, Y.S.; KAN, Y.W.; RUTTER, W.J. Cloning, sequencing, and chromosomal localization of human term placental alkaline phosphatase cDNA. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 82, p. 8715-8719, 1985.

KATES, S.A.; ALBERICIO, A. **Solid-phase synthesis: a practical guide**. New York, NY: Marcel Dekker, 2000.

KEIDING, N.R. The alkaline phosphatase fractions of human lymph. **Clin Sci**, London, v. 26, p. 291-197, 1964.

KNOLL, B.J.; ROTHBLUM, K.N.; LONGLEY, M. Two gene duplication events in the evolution of the heat-stable alkaline phosphatases. **Gene**, Amsterdam, v. 60, p.267-276, 1987.

KNOLL, B.J.; ROTHBLUM, K.N.; LONGLEY, M. Nucleotide sequence of the human placental alkaline phosphatase gene. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 263, n. 24, p. 12020-12026, 1988.

KOSHIDA, K.; WAHREN, B. Placental-símile alkaline phosphatase in seminoma. **Urol Res**, v. 18, p. 87-92, 1990.

KOSHIDA, K.; STIGBRAND, T.; MUNCK-WIKLAND, E.; HISAZUMI, H.; WAHREN, B. Analysis of serum placental alkaline phosphatase activity in testicular cancer and cigarette smokers. **Urol Res**, v. 18, p. 169-173, 1990.

KOSHIDA, K.; UCHIBAYASHI, T.; YAMAMOTO, H.; YOKOYAMA, K.; HIRANO, K. A potential use of a monoclonal antibody to placental alkaline phosphatase (PLAP) to detect lymph node metastases of seminoma. **J Urol**, v. 155, p. 337-341, 1996a.

KOSHIDA, K.; UCHIBAYASHI, T.; YAMAMOTO, H.; HIRANO, K. Significance of placental alkaline phosphatase (PLAP) in the monitoring of patients with seminoma. **Br J Urol**, Oxford, v. 77, p. 138-142, 1996b.

KOSHIDA, K.; YOKOYAMA, K.; IMAO, T.; KONAKA, H.; HIRANO, K.; UCHIBAYASHI, T.; NAMIKI, M. Immunolocalization of anti-placental alkaline phosphatase monoclonal antibody in mice with testicular tumors and lymph node metastasis. **Urol Res**, v. 26, n.1, p. 23-28, 1998.

KOZLENKOV, A.; MANES, T.; HOYLAERTS, M.F.; MILLÁN, J.L. Function assignment to conserved residues in mammalian alkaline phosphatases. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 277, n. 25, p. 22992-22999, 2002.

LATRONICO, A.C.; PINTO, E.M.; DOMENICE, S.; FRAGOSO, M.C.B.V.; MARTIN, R.M.; ZERBINI, M.C.; LUCON, A.M.; MENDONÇA, B.B. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol**, n. 86, p. 4970-4973, 2001.

LE DU, M.H.; STIGBRAND, T.; TAUSSIG, M.J.; MENÉZ, A.; STURA, E.A. Cristal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 276, p. 9158-9165, 2001.

LE DU, M.H.; MILLÁN, J.L. Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 277, p. 49808-49814, 2002.

LETHO, M.T.; SHAROM, F.J. Proximity of the protein moiety of a GPI-anchored protein to the membrane surface: a FRET study. **Biochemistry**, Washington, v. 41, p. 8368-8376, 2002.

LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CANCER (LPCC). Relatório epidemiológico: RHC 2000 2002. Curitiba, LPCC, 2004. 89 p. Disponível em: <<http://www.lpcc.org.br/rhc>> Acesso em: 02/jan./05.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKI, A.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular cell biology**. 4.ed. New York: Freeman, 2000. 1084 p.

LINDBLOM, A.; LILJEGREN, A. Tumor markers in malignancies. **BJU Internacional**, Edinburgh, v. 320, p. 424-427, 2000.

MALKIN A.; KELLEN, J.A.; LICKRISH, G.M.; BUSH, R.S. Carcinoembryonic antigen (CEA) and other tumor markers in ovarian and cervical cancer. **Cancer**, v. 42, n. 3, p. 1452-1455, 1978.

MANO, H.; FURUHASHI, Y.; MORIKAWA, Y.; HATTORI, S.; GOTO, S.; TOMODA, Y. Radioimmunoassay of placental alkaline phosphatase in ovarian cancer sera and tissues. **Obstetr Gynecol**, v. 68, n. 6, p. 759-764, 1986.

MANIVEL J.C.; JESSURUN, J.; WICK, M.R.; DEHNER, L.P. Placental alkaline phosphatase immunoreactivity in testicular germ-cell neoplasms. **Am J Surg Pathol**, v. 11, n. 1, p.21-29, 1987.

MARTIN, D.; TUCKER, D.F.; GORMAN, P.; SHEER, D.; SPURR, N.K.; TROWSDALE, J. The human placental alkaline phosphatase gene and related sequences map to chromosome 2 band q37. **Ann Hum Genet**, Cambridge, v. 51, p. 145-152, 1987.

McLAUGHLIN, P.J.; GEE, L.; JOHNSON, P.M. Placental-type alkaline phosphatase in pregnancy and malignancy plasma: specific estimation using a monoclonal antibody in a solid phase enzyme immunoassay. **Clin Chim Acta**, v. 130, p. 199-209, 1983.

MICANOVIC, R.; KODUKULA, K.; GERBER, L.D.; UDENFRIEND, S. Selectivity at the cleavage/attachment site of phosphatidylinositol-glycan anchored membrane proteins is enzymatically determined. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 87, p. 7939-7943, 1990.

MILLÁN, J.L.; STIGBRAND, T. "Sandwich" enzyme immunoassay for placental alkaline phosphatase. **Clin Chem**, v. 27, n. 12, p. 2014-2018, 1981.

MILLÁN, J.L.; ERIKSSON, A.; STIGBRAND, T. A possible new locus of alkaline phosphatase expressed in human testis. **Hum Genet**, Berlin, v. 62, p. 293-295, 1982.

MILLÁN, J.L.; STIGBRAND, T. Antigenic determinants of human placental and testicular placental-símile alkaline phosphatases as mapped by monoclonal antibodies. **Eur J Biochem**, Bélgica, v. 136, p. 1-7, 1983.

MILLÁN, J.L. Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 267, n. 7, p. 3112-3115, 1986.

MILLÁN, J.L.; MANES, T. Seminoma-derivate Nagao isozyme is encoded by a germ-cell alkaline phosphatase gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 85, p. 3024-3028, 1988.

MILLÁN, J.L.; FISHMAN, W.H. Biology of human alkaline phosphatases with special reference to cancer. **Crit Rev Clin Lab Sci**, Boca Raton, v. 32, n. 1, p 1-39, 1995.

MOROWITZ, M.; HUFF, D.; VON ALLMEN, D. Epithelial ovarian tumors in children: a retrospective analysis. **J Pediatr Surg**, v. 38, n. 3, p. 331-335, 2003.

MOSS, W.D. Perspectives in alkaline phosphatase research. **Clin Chem**, Baltimore, v. 38, n. 12, p. 2486-2492, 1992.

MOSTOFI, F.K.; SESTERHENN, I.A.; DAVIS, C.J. Immunopathology of germ-cell tumors of the testis. **Semin Diagn Pathol**, p. 320-341, 1987.

MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. 4. ed. São Paulo: Robe Editorial, 2003. 419 p.

MOURA, J.F.; DELACERDA, L.; SANDRINI, R.; BORBA, F.M.; CASTELO, D.N.; SADE, E.R.; SELLA, S.; MINOZZO, J.C.; CALLEFE, L.G.; FIGUEIREDO, B.C. ELISA for determination of human growth hormone: recognition of helix 4 epitopes. **J Biomed Biotechnol**, v. 3, p. 143-149, 2004.

MUENSCH, H.A.; MASLOW, W.C.; AZAMA, F.; BERTRAND, M.; DEHWURST, P.; HARMAN, B. Placental-simile alkaline phosphatase: re-evaluation of the tumor marker with exclusion of smokers. **Cancer**, New York, v. 58, p. 1689-1694, 1986.

MUNRO, A.J.; NIELSEN, O.S.; DUNCAN, W.; STURGEON, J.; GOSPODAROWICZ, M.K.; MALKIN, A.; THOMAS, G.M.; JEWETT, M.A.S. An assessment of combined tumour markers in patients with seminoma: placental alkaline phosphatase (PLAP), lactate dehydrogenase (LD) and  $\beta$  human chorionic gonadotrophin ( $\beta$ -HCG). **Br J Cancer**, v. 64, p. 537-542, 1991.

NATHANSON, L.; FISHMAN, W. New observations on the Reagan isoenzyme of alkaline phosphatase in cancer patients. **Cancer**, v. 27, n. 6, p. 1388-1397, 1971.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). **Tumor markers, 1998**. Disponível em: <[http://cis.nci.nih.gov/fact/5\\_18.htm](http://cis.nci.nih.gov/fact/5_18.htm)> Acesso em: 23 mar. 2004.

NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). NCBI Chemical Data (ASN). **MMDB[1]**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?form=6&db=t&Dopt=s&uid=15825>> Acesso em: 20 ago. 2003.

NEWLANDS, E.S.; HOLDEN, L.; BAGSHAW, K.D. Tumour markers and POMB/ACE chemotherapy in the management of ovarian germ cell tumours (GCTs). **Int J Biol Markers**, v.3, n.3, p.185-92, 1988.

NOZAWA, S.; UDAGAWA, Y.; OHKURA, H.; NEGISHI, Y.; AKIYA, K.; INABA, N.; TAKAMIZAWA, H.; KIMURA, E.; TERASHIMA, Y. Serum placental alkaline phosphatase (PLAP) in gynecologic malignancies – with special reference to the combination of PLAP and CA 54/61 assay. **Clin Chim Acta**, v. 186, p. 275-284, 1989.

NOURI, A.M.E.; TORABI-POUR, N.; DABARE, A.A.N.P.M. A new highly specific monoclonal antibody against placental alkaline phosphatase: a potential marker for the early detection of testis tumor. **BJU International**, Edinburgh, v. 86, p. 894-900, 2000.

OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 32, n. 2, p. 230-240, 1953.

PAIVA, J.; DAMJANOV, I.; LANGE, P.H.; HARRIS, H. Immunohistochemical localization of placental-símile alkaline phosphatase in testis and germ-cell tumors using monoclonal antibodies. **Am J Pathol**, v. 111, n. 2, p. 156-164, 1983.

PIANOVSKI, M.A.D.; MALUF, E.M.C.P.; CARVALHO, D.S.; RIBEIRO, R.C.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; BOFFETTA, P.; ZANCANELLA, P.; FIGUEIREDO, B.C. Mortality rare of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. **Pediatr Blood Cancer** (no prelo).

PORATH, J.; AXÉN, R.; ERNBACK, S. Chemical coupling of proteins to agarose. **Nature**, London, v. 215, p. 1491-1492, 1967.

PRICE, C.P. Multiple forms of human serum alkaline phosphatase: detection and quantification. **Ann Clin Biochem**, London, v. 30, p. 355-372, 1993.

REDKAR, S.L.; DAMLE, S.R. Placental alkaline phosphatase in patients with seminoma measured by ELISA as compared to RIA. **Indian J Cancer**, v. 34, p. 73-76, 1997.

RIBEIRO R. C.; SANDRINI, F.; FIGUEIREDO, B.C.; ZAMBETTI, G.P.; MICHALKIEWICZ, E.; LAFFERTY, A.R.; DELACERDA, L.; RABIN, M.; CADWELL,

C.; SAMPAIO, G.; CAT, I.; STRATAKIS, A.; SANDRINI, R. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington DC, v. 98, n. 16, p. 9330-9335, 2001.

RIBEIRO R. C.; FIGUEIREDO, B.C. Childhood adrenocortical tumours. **Eur J Cancer**, v.40, p.1117-1126, 2004.

ROBSON, E.B.; HARRIS, H. Further studies on the genetics of placental alkaline phosphatase. **Ann Hum Genet.**, London, v. 30, p. 219-232, 1967.

RODRIGUES, G.A.; JENKINS, J.; RIBEIRO, R.C.; ZAMBETTI, G.; LALLI, E.; MICHALKIEWICZ, E.; PIANOVSKI, M.A.D.; STINGHEN, S.T.; FIGUEIREDO, B.C. Childhood adrenocortical tumor expresses placental alkaline phosphatase. (Submetido).

ROELOFS, H.; MANES, T.; JANSZEN, T.; MILLÁN, J.L.; OOSTERHUIS, J.W.; LOOIJENGA, L.H.J. Heterogeneity in alkaline phosphatase isozyme expression in human testicular germ cell tumors: an enzyme-/immunohistochemical and molecular analysis. **J Pathol**, v. 189, p. 236-244, 1999.

SASLOWSKY, D.E.; LAWRENCE, J.; REN, X.; BROWN, D.E.; HENDERSON, R.M.; EDWARDSON, J.M. Placental alkaline phosphatase is efficiently targeted to rafts in supported lipid bilayers. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 277, n. 30, p. 26966-26970, 2002.

SATO, M.; FURIYA, K.; TANAKA, S.; SAKAGISHI, Y.; KOMODA, T. Allelic polymorphism of human placental alkaline phosphatase in three races: sugar chain heterogeneities. **Clin Chim Acta**, Amsterdam, v. 178, p. 101-108, 1988.

SHINODA, J.; YAMADA, H.; SAKAI, N.; ANDO, T.; HIRATA, T.; MIWA, Y. Placental alkaline phosphatase as a tumor marker for primary intracranial germinoma. **J Neurosurg**, v. 68, p. 710-720, 1988.

SMITH, M.; WEISS, M.J. GRIFFIN, C.A.; MURRAY, J.C.; BUETOW, K.H.; EMANUEL, B.S.; HENTHORN, P.S.; HARRIS, H. Regional assignment of the gene for human liver/bone/kidney alkaline phosphatase to chromosome 1q36.1-p34. **Genomics**, San Diego, v. 2, p. 139-143, 1988.



TATEKAWA, Y.; KEMMOTSU, H.; MOURI, T.; JOE, K.; OHKAWA, H. A case of ovarian pediatric dysgerminoma associated with high serum levels and positive immunohistochemical staining of neuron-specific enolase. **J Pediatr Surg**, v. 39, n. 9, p. 1437-1439, 2004.

TUCKER, D.F.; OLIVER, R.T.D.; TRAVERS, P.; BODMER, W.F. Serum marker potential of placental alkaline phosphatase-símile activity in testicular germ cell tumours evaluated by H17E2 monoclonal antibody assay. **Br J Cancer**, v. 51, p. 631-639, 1985.

USATEGUI-GOMEZ, M.; YEAGER, F.M.; TARBUTTON, P. Purification of human placental alkaline phosphatase by isoelectric focusing. **Clin Chim Acta**, Amsterdam, v. 50, p. 405-412, 1974.

UCHIDA, T.; SHIMODA, T.; MIYATA, H.; SHIKATA, T.; IINO, S.; SUZUKI, H.; ODA, T.; HIRANO, K.; SUGIURA, M. Immunoperoxidase study of alkaline phosphatase in testicular tumor. **Cancer**, v. 48, n. 6, p. 1455-1462.

VAN HOUWELINGEN, J.C.; BOKKEL HUININK, W.W.; VAN DER BURG, M.E.; OOSTEROM, A.T.; NEIJT, J.P. Predictability of the survival of patients with advanced ovarian cancer. **J Clin Oncol**, v. 7, n. 6, p. 769-773, 1989.

VERGOTE, I.; ONSRUD M.; NUSTAD, K. Placental alkaline phosphatase as a tumor marker in ovarion cancer. **Obstet Gynecol**, v. 69, p. 228-232, 1987.

VERGOTE, I.B.; ABELER, V.M.; BORMER, O.P.; STIGBRAND, T.; TROPÉ, C.; NUSTAD, K. CA125 and placental alkaline phosphatase as serum tumor markers in epithelial ovarian carcinoma. **Tumor Biol**, v. 13, p. 168-174, 1992.

WADA, N.; CHOU, J.Y. Characterization of upstream activation elements essential for the expression of germ cell alkaline phosphatase in human choriocarcionma cells. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 268, p 14003-14010, 1993.

WATANABE, S.; WATANABE, T.; LI, W.B.; SONG, B.W.; CHOU, J.Y. Expression of the germ cell alkaline phosphatase gene in human choriocarcinoma cells. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 264, n. 21, p. 12611-12619, 1989.

WATANABE, H.; TOKUYAMA, H.; OHTA, H.; SATOMURA, Y.; OKAI, T.; OOI, A.; MAI, M.; SAWABU, N. Expression of placental alkaline phosphatase gene in gastric and colorectal cancer. **Cancer**, v. 66, n. 12, p. 2575-2582, 1990.

WATANABE, T.; WADA, N.; KIM, E.E.; WYCKOFF, H.W.; CHOU, J.Y. Mutation of a single amino acid converts germ cell alkaline phosphatase to placental alkaline phosphatase. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 266, n. 31, p. 21174-21178, 1991.

WEHRSCUTZ, M.; STOGER, H.; PLONER, F.; HOFMANN, G.; WOLF, G.; HOFER, G.; KRIPPL, P.; SMONIGG, H. Seminoma metastases mimicking primary pancreatic cancer. **Onkologie**, n. 25, v. 4, p. 371-373, 2002.

WEISS, M.J.; RAY, K.; HENTHORN, P.S.; LAMB, B.; KADESCH, T.; HARRIS, H. Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 263, p. 12002-12010, 1988.

WEISSBACH, L.; BUSSAR-MAATZ; MANN, K. The value of tumor markers in testicular seminomas. **Eur Urol**, Basel, v. 32, p. 16-22, 1997.

WILLIAMS, G.H.; McLAUGHLIN, P.J.; JOHNSON, P.M. Tissue origin of serum placental-simile alkaline phosphatase in cigarette smokers. **Clin Chim Acta**, Amsterdam, v. 155, p. 329-334, 1986.

YOUNG, N.S.; CURD, J.G.; EASTLAKE, A.; FURIE, B.; SCHECHTER, A.N. Isolation of antibodies specific to sickle hemoglobin by affinity chromatography using a synthetic peptide. **Proc Nat Acad Sci USA**, Washington, v. 72, n. 12, p. 4759-4763, 1975.

## **APÊNDICES**

APÊNDICE 1 - UNIDADES DE PESO E MEDIDA .....	88
APÊNDICE 2 - NOMENCLATURA DE AMINOÁCIDOS .....	90
APÊNDICE 3 - RESULTADOS DE hPLAP/PLAP-SÍMILE EM 93 DOADORES DE SANGUE.....	92

## **APÊNDICE 1 – UNIDADES DE PESO E MEDIDA**

## APÊNDICE 1 – UNIDADES DE PESO E MEDIDA

AMINOÁCIDO	ABREVIATURA (3 LETRAS)	ABREVIATURA (1 LETRA)
Alanina	Ala	A
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

FONTE: LODISH *et al.*, 2000.

## **APÊNDICE 2 – NOMENCLATURA DE AMINOÁCIDOS**

## APÊNDICE 2 – NOMENCLATURA DOS AMINOÁCIDOS

AMINOÁCIDO	ABREVIATURA (3 LETRAS)	ABREVIATURA (1 LETRA)
Alanina	Ala	A
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

FONTE: LODISH *et al.*, 2000.

**APÊNDICE 3 – RESULTADOS DE hPLAP/PLAP-SÍMILE EM  
DOADORES DE SANGUE**



## APÊNDICE 3 – RESULTADOS DE hPLAP/PLAP-SÍMILE EM 93 DOADORES DE SANGUE

Continua

Nº	SEXO	IDADE	FUMANTE	ICA-PLAP (U/l)	ICA-PEP (U/l)
1	M	31	P	0	0
2	M	53	P	0	0
3	M	22	P	0	0
4	F	20	N	0	0
5	M	33	N	0	0
6	F	19	P	0	0
7	M	33	N	0	0
8	F	34	N	0	0
9	F	43	N	0	0
10	F	25	N	0	0
11	M	34	N	0	0
12	F	30	P	0	0
13	F	38	S	0,34	0,33
14	F	27	P	0	0
15	F	21	N	0,12	0,1
16	F	21	N	0	0
17	M	45	N	0,18	0,15
18	M	45	N	0	0
19	F	29	N	0	0
20	M	46	S	0,23	0,15
21	M	25	P	0	0
22	F	44	P	0,54	0,15
23	F	45	P	1,72	1,65
24	F	53	P	1,09	0,95
25	M	24	S	0	0
26	M	44	P	0	0
27	M	55	S	0,2	0,28
28	F	29	S	0,32	0,25
29	M	32	S	1,13	1
30	M	39	S	0	0
31	M	44	P	0,17	0
32	M	20	S	0,18	0,25
33	F	19	P	0	0
34	F	21	P	0	0
35	F	48	S	0,73	0,55
36	M	43	S	0,14	0
37	M	24	S	0,37	0
38	M	21	S	0,13	0
39	M	23	S	0,19	0,16
40	M	44	S	0,29	0,16
41	F	36	N	0	0
42	F	20	N	0	0
43	M	20	N	0,1	0
44	M	40	N	0	0
45	M	30	S	0,16	0,1
46	F	30	N	0,16	0
47	F	24	N	0	0
48	M	47	N	0	0
49	F	47	N	0,16	0

					Conclusão
Nº	SEXO	IDADE	FUMANTE	ICA-PLAP (U/l)	ICA-PEP (U/l)
50	F	19	N	0	0
51	F	32	N	0	0
52	M	29	S	0,66	0,35
53	M	22	N	0	0
54	M	45	N	0,27	0,19
55	M	50	N	0	0
56	F	26	N	0	0
57	M	42	N	0	0
58	M	46	S	0,34	0,25
59	M	21	N	0	0
60	F	21	S	0	0
61	M	48	N	0	0
62	F	43	N	0,25	0
63	F	22	N	0	0
64	M	33	N	0,27	0
65	F	33	N	0	0
66	F	36	N	0,18	0
67	M	34	N	0	0
68	F	26	N	0	0
69	M	50	N	0	0
70	M	28	N	0,13	0
71	F	29	S	0,19	0
72	M	41	S	0	0
73	F	31	N	0	0
74	M	44	N	0,2	0
75	M	23	N	0	0
76	M	30	S	0	0
77	M	22	N	0	0
78	F	26	N	0,14	0
79	M	26	N	0,6	0
80	F	33	S	0,25	0
81	M	55	S	1	0,89
82	M	57	S	0,4	0,23
83	M	35	S	0,9	0,7
84	F	31	S	1,02	0,75
85	M	43	S	1,2	0,89
86	F	41	S	0,78	0,6
87	M	47	S	1	0,6
88	M	39	S	0,53	0,4
89	M	31	S	0,4	0,35
90	M	44	S	0,3	0
91	F	33	S	0,2	0
92	M	39	S	0,2	0,39
93	M	33	S	0,2	0

NOTAS: M – masculino; F – feminino; N – não fumantes; P – fumantes ocasionais (menos de 15 cigarros por dia); S – fumantes (mais de 15 cigarros por dia).

## **ANEXOS**

ANEXO 1 - CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS – CEP – HC -UFPR .....	96
ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES .....	98
ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA GRUPO CONTROLE .....	103

**ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA  
EM PESQUISA EM SERES HUMANOS**

ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
EM SERES HUMANOS

**ANEXO 2– TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E  
ESCLARECIDO PARA PACIENTES**

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PACIENTES**

### **DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA PLACENTÁRIA HUMANA (hPLAP) E PLAP-SÍMILE**

Este trabalho será realizado no Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças (CEGEMPAC) de Curitiba, Paraná, sob a coordenação do Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo. Neste projeto de pesquisa, estamos desenvolvendo um exame de sangue para detectar a presença de uma proteína (enzima) denominada Fosfatase Alcalina Placentária Humana (hPLAP). Esta proteína é produzida normalmente pela mulher durante a gestação, em fumantes (mais de 15 cigarros/dia) e em pequena quantidade por pessoas saudáveis. Esta proteína também pode estar presente em alguns tipos de câncer, como por exemplo, câncer de testículo, ovário, pulmão, estômago, intestino e tumor de córtex da glândula adrenal. Os resultados obtidos podem nos ajudar a desenvolver um exame laboratorial para detectar estes tipos de câncer. Você e seu filho estão sendo convidados a participar deste estudo. Para tanto, precisaremos colher amostras de sangue do seu filho, ou necessitaremos pesquisar diretamente no tumor, nos casos em que for feito cirurgia.

Solicitamos a você que permita que sua criança participe desta pesquisa. Este termo de consentimento lhe dá informações sobre o estudo. Assim que você entender este estudo e concordar em participar, você será solicitado a assinar este termo de consentimento e receberá uma cópia.

Antes de compreender este estudo, é importante que você saiba o seguinte:

- Fica inteiramente a seu critério decidir se sua criança participa ou não deste estudo. A participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar do estudo, ou se aceitar participar, retirar seu consentimento a qualquer momento.
- Caso você decida não permitir que sua criança participe deste estudo, ou que venha mais tarde a desistir de continuar neste estudo, isto não implicará na interrupção do seu atendimento, que está assegurado.

#### **Por que este estudo está sendo realizado?**

O objetivo deste estudo é desenvolver um exame de sangue para determinação da Fosfatase Alcalina Placentária Humana (hPLAP) e verificar sua presença em pacientes com tumor de córtex de adrenal, ovário, testículo, pulmão, estômago e intestino.

#### **Quantos pacientes participarão deste estudo?**

Não há limite para o número de pacientes que podem participar; pretendemos incluir pelo menos 10 pacientes.

#### **O que deverá ser feito durante esse estudo?**

Caso você e seu filho concordem em participar desse estudo, será necessário colher uma amostra de sangue quando seu filho estiver internado para tratamento ou necessitaremos pesquisar diretamente no tumor, nos casos em que for feito cirurgia.

#### **Quanto tempo a criança permanecerá neste estudo?**

Não haverá limite de tempo para este estudo. A identidade da criança e o lugar onde ele ou ela está sendo tratado não será revelado. Depois de terminadas as análises você será avisado sobre as conclusões da pesquisa e o que sobrou do sangue ou do tumor será armazenado no CEGEMPAC para se necessário repetir a mesma pesquisa ou fazer outro estudo se você assim permitir mediante novo termo de consentimento.

**Quais são as consequências da desistência de continuar neste estudo?**

Você poderá desistir de permitir que sua criança continue neste estudo a qualquer momento. Independentemente de qual seja a sua escolha, os melhores cuidados disponíveis no serviço serão oferecidos para sua criança.

**Quais são os riscos deste estudo?**

O estudo não oferece riscos adicionais a sua criança.

**Quais são os benefícios deste estudo?**

Sua criança poderá não receber qualquer benefício deste estudo. Entretanto, as informações obtidas a partir deste estudo poderão propiciar aos pesquisadores conhecer melhor sobre as causas deste tipo de câncer e entender sobre melhores maneiras de diagnosticar esta doença.

**Que outras opções existem?**

Você poderá escolher não participar deste estudo. Sua criança poderá sair do mesmo em qualquer momento. Mesmo que ela saia, terá a mesma cobertura nos cuidados médicos que, normalmente, teria fora deste estudo.

**Como obter informação nova?**

O médico da sua criança será informado sobre qualquer informação nova obtida durante o curso desta pesquisa. Você também tem o direito de saber sobre os resultados deste estudo e será notificado quando necessário. Poderá receber informações e respostas para suas perguntas em qualquer fase deste trabalho ou mesmo na conclusão. Se desejar saber mais sobre quando e como obter os resultados desta pesquisa você poderá contatar o Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo pelo telefone 41-3029-3204.

**O que dizer sobre confidencialidade?**

O termo de consentimento esclarecido ficará com o médico da sua criança, uma segunda cópia com você e uma terceira será mantida no CEGEMPAC.

Os prontuários com todos os dados clínicos das crianças são protegidos de acordo com determinações das leis brasileiras, através do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP – Brasília). Informações obtidas deste estudo poderão ser usadas em relatórios, apresentações e publicações, mas o nome da sua criança não será incluído.

**O que dizer sobre custos e pagamentos?**

Não haverá custos para sua criança participar deste estudo. Nem você ou o médico da sua criança serão pagos para fornecer amostras de sangue ou do tumor.

**O que dizer sobre compensação por doença ou injúria?**

Nenhum tipo de tratamento está envolvido neste estudo. Portanto, é muito pouco provável que sua criança esteja correndo qualquer forma de risco como ficar doente ou ser lesado em decorrência deste estudo. Mesmo sendo bastante remota a possibilidade de ocorrer algum prejuízo moral ou financeiro, dano físico ou comprometimento da saúde de seu filho, entendemos que você poderá apresentar sua queixa ou qualquer pergunta sobre esta pesquisa ao Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo em Curitiba-PR (tel.: 41-361-5250 ou 41-3029-3204). Se você tiver qualquer dúvida sobre os direitos da sua criança, você como indivíduo que participa da pesquisa, poderá entrar em contato com o responsável pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (tel.: 41-360-1896).



### DECLARAÇÃO DE ENTENDIMENTO

Eu li o texto acima e aceito de livre e espontânea vontade que minha criança tome parte neste estudo.

Tive a oportunidade de conversar tanto quanto eu quis com o farmacêutico e/ou médico \_\_\_\_\_, que está cuidando da minha criança, sobre as razões deste estudo e sobre seus riscos.

Eu fui informado(a) que não haverá custos adicionais para que minha criança participe desta pesquisa.

Eu entendi que sou livre para interromper a participação da minha criança no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete o tratamento dela com o seu médico.

Fui informado(a) que é norma do Hospital de Clínicas da UFPR, sediado em Curitiba, não pagar para qualquer um que participe de estudos como esse, nem por tratamentos recebidos pelos participantes, nem por produtos ou valores obtidos deste estudo.

Fui informado(a) que poderei apresentar queixa caso aconteça algo com minha criança por participar deste estudo. Fui informado(a) também que os investigadores do CEGEMPAC tratarão de dar o suporte necessário, caso ocorra qualquer injúria decorrente de algum ato ligado à participação de minha criança nesta pesquisa. Estou ciente de que isso será feito dentro das possibilidades do Hospital de Clínicas da UFPR, usando suas equipes e sua infra-estrutura.

Fui informado que os dados clínicos da minha criança e os resultados das pesquisas não serão disponibilizados para qualquer pessoa fora deste hospital sem minha permissão. Fui informado também que quando surgir outra pesquisa pelo mesmo grupo, eu serei consultado para decidir se permitirei ou não o uso das amostras de sangue na nova pesquisa.

Estou ciente de que quando eu precisar esclarecer mais dúvidas a respeito deste estudo ou sobre qualquer injúria ocorrida por causa da participação de minha criança neste projeto poderei telefonar para o Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo em Curitiba (tel 41-361-5250 ou 41-3029-3204).

Sei que poderei obter mais informações sobre os meus direitos como participante deste estudo através do escritório do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Curitiba (tel. 41-360-1896).

Receberei uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido.



**ANEXO 3– TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
PARA GRUPO CONTROLE**

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO GRUPO CONTROLE**

### **DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA PLACENTÁRIA HUMANA (hPLAP) E PLAP-SÍMILE**

Este trabalho será realizado no Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças (CEGEMPAC) de Curitiba, Paraná, sob a coordenação do Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo. Neste projeto de pesquisa, estamos desenvolvendo um exame de sangue para detectar a presença de uma proteína (enzima) denominada Fosfatase Alcalina Placentária Humana (hPLAP). Esta proteína é produzida normalmente pela mulher durante a gestação, em fumantes (mais de 15 cigarros/dia) e em pequena quantidade por pessoas saudáveis. Esta proteína também pode estar presente em alguns tipos de câncer, como por exemplo, câncer de testículo, ovário, pulmão, estômago, intestino e tumor de córtex da glândula adrenal. Os resultados obtidos podem nos ajudar a desenvolver um exame laboratorial para detectar estes tipos de câncer. Precisamos de amostras de sangue de pessoas saudáveis (doadores de sangue) e gestantes (controle positivo) para padronizar o teste. Você está sendo convidado a participar deste estudo. Para tanto, precisaremos separar uma pequena amostra de sangue sua, após a realização dos exames no Banco de Sangue.

- **Fica inteiramente a seu critério decidir se participa ou não deste estudo. A participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar do estudo, ou se aceitar participar, retirar seu consentimento a qualquer momento.**

#### **Quais são os riscos deste estudo?**

O estudo não lhe oferece riscos adicionais.

#### **Quais são os benefícios deste estudo?**

Você poderá não receber qualquer benefício deste estudo. Entretanto, as informações obtidas a partir deste estudo poderão propiciar aos pesquisadores conhecer melhor sobre as causas destes tipos de câncer e entender sobre melhores maneiras de diagnosticar esta doença.

#### **Que outras opções existem?**

Você poderá escolher não participar deste estudo. Você poderá sair do mesmo em qualquer momento. Mesmo que você saia, terá a mesma cobertura nos cuidados médicos que, normalmente, teria fora deste estudo.

#### **O que dizer sobre confidencialidade?**

O termo de consentimento esclarecido ficará com o seu médico, uma segunda cópia com você e uma terceira será mantida no CEGEMPAC. Os prontuários com todos os dados clínicos são protegidos de acordo com determinações das leis brasileiras, através do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP – Brasília). Informações obtidas deste estudo poderão ser usadas em relatórios, apresentações e publicações, mas o seu nome não será incluído.

#### **O que dizer sobre custos e pagamentos?**

Não haverá custos para você participar deste estudo. Nem você ou seu médico serão pagos para fornecer amostras de sangue.

#### **O que dizer sobre compensação por doença ou injúria?**

Nenhum tipo de tratamento está envolvido neste estudo. Portanto, é muito pouco provável que você esteja correndo qualquer forma de risco como ficar doente ou ser lesado em decorrência deste estudo. Mesmo assim, você poderá apresentar sua queixa ou qualquer pergunta sobre esta pesquisa ao Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo em Curitiba-PR (tel.: 41-3029-3204). Se você tiver qualquer dúvida sobre os seus direitos da sua criança, poderá entrar em contato com o responsável pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (tel.: 41-360-1896).

### DECLARAÇÃO DE ENTENDIMENTO

1. Eu li o texto acima e aceito de livre e espontânea vontade tomar parte neste estudo.
2. Tive a oportunidade de conversar tanto quanto eu quis com a enfermeira e/ou farmacêutico e/ou médico \_\_\_\_\_, sobre as razões deste estudo e sobre seus riscos.
3. Estou ciente de que quando eu precisar esclarecer mais dúvidas a respeito deste estudo ou sobre qualquer injúria ocorrida por causa da minha participação neste projeto poderei telefonar para o Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo em Curitiba (tel 41-361-5250 ou 41-3029-3204).
4. Sei que poderei obter mais informações sobre os meus direitos como participante deste estudo através do escritório do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Curitiba (tel. 41-360-1896).
5. Receberei uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido.

### DECLARAÇÃO DO DOADOR DE SANGUE (OU OUTRO GRUPO CONTROLE)

Declaro que recebi todas as informações sobre este projeto de pesquisa. Eu concordo em participar desta pesquisa.

Nome do doador (ou outro grupo controle): \_\_\_\_\_

Código: \_\_\_\_\_

FUMANTE:

☐

NÃO

☐

SIM (menos de 15 cigarros/dia)

☐

SIM (mais de 15 cigarros/dia)

SEXO: F

☐

M

☐

IDADE:

\_\_\_\_\_

Assinatura

Data

Hora

### DECLARAÇÃO DO MÉDICO/PESQUISADOR OU DE PESSOA DESIGNADA PELO MÉDICO RESPONSÁVEL

Eu, abaixo assinado, certifico que discuti o projeto de pesquisa com o participante. Expliquei todas as informações apresentadas neste termo de consentimento, incluindo quaisquer riscos que possam ocorrer. Ainda declaro que o doador (ou outro grupo controle) foi incentivado a fazer perguntas sobre esse estudo.

Médico/Investigador/Designado: \_\_\_\_\_

Data

Hora

### DECLARAÇÃO DA TESTEMUNHA

Eu acompanhei o processo de consentimento informado e certifico que a pesquisa, riscos e benefícios foram apresentados ao doador (ou outro grupo controle).

Testemunha: \_\_\_\_\_

Data

Hora

Em caso de perguntas ou emergências com referência a esse protocolo, por favor contatar diretamente: Dr. Bonald C. Figueiredo ou Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Curitiba